

## **PLANT RESISTANT TO ENVIRONMENTAL STRESS**

Publication number: JP2000116260

**Publication date:** 2000-04-25

**Inventor:** SHINOZAKI KAZUKO; KASUGA YOSHIE

**Applicant:** JAPAN INTERNAT RES CT FOR AGRI; SASAKI CO

**Classification:**

**- international:** C12N15/09; A01H5/00; C07K14/415; C12N15/29;  
C12N15/82; C12N15/09; A01H5/00; C07K14/415;  
C12N15/29; C12N15/82; (IPC1-7): A01H5/00;  
C07K14/415; C12N15/09

- European: C12N15/82C8B2

**Application number:** JP19980292348 19981014

**Priority number(s):** JP19980292348 19981014

**Also published as:**



US6670528 (B1)



US2005235381 (A1)



CA2269105 (A1)

**Report a data error here**

## Abstract of JP2000116260

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject plant with improved resistance to environmental stresses, e.g. those caused by drought, cold weather and salt, without being stunted, by including a gene with a DNA, to which a gene coding for a specific transcription factor is connected, in a stress-responsive promoter.

**SOLUTION:** This plant is a transgenic one, with a DNA connected to a stress-responsive promoter (e.g.  $\gamma$ d29A gene promoter), the DNA having an amino acid sequence (e.g. that shown by the formula) and coding for a transcription factor (e.g. DREB1 protein), wherein the transcription factor is connected to the stress-responsive promoter, and can activate transcription of the gene coding for the transcription factor. It is preferable to produce the transgenic plant by introducing a DAN, to which the gene coding for the transcription factor is connected, in the stress-responsive promoter.

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Pro Thr Leu Ala Ser Ser  
 20 35 50

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-116260

(P2000-116260A)

(43)公開日 平成12年4月25日 (2000.4.25)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

A 01 H 5/00  
C 07 K 14/415  
C 12 N 15/09

識別記号

ZNA

F I

A 01 H 5/00  
C 07 K 14/415  
C 12 N 15/00

テーマコード(参考)

A 2B030  
4B024  
ZNA A 4H045

審査請求 有 請求項の数8 OL (全36頁)

(21)出願番号 特願平10-292348

(22)出願日 平成10年10月14日 (1998.10.14)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年5月5日  
日本植物生理学会開催の「1998年度日本植物生理学会年会」において文書をもって発表

(71)出願人 591286568

農林水産省国際農林水産業研究センター所長

茨城県つくば市大わし1-2

(71)出願人 000195568

生物系特定産業技術研究推進機構  
埼玉県大宮市日進町1丁目40番地2

(72)発明者 篠崎 和子

茨城県稻敷郡笠崎町高見原2-4-15

(72)発明者 春日 美江

茨城県つくば市並木2-14-301-501

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 環境ストレス耐性植物

(57)【要約】

【課題】 環境ストレス耐性植物

【解決手段】 ストレス応答性プロモーターの下流に以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAが連結された遺伝子を含むトランスジェニック植物の提供。

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8  
若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8  
若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ストレス応答性プロモーターの下流に以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAが連結された遺伝子を含むトランスジェニック植物。

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

【請求項2】 ストレス応答性プロモーターの下流に以下の(c)又は(d)のDNAが連結された遺伝子を含むトランスジェニック植物。

(c) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7若しくは配列番号9で表される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7若しくは配列番号9で表される塩基配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNA

【請求項3】 ストレスが乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスである請求項1又は2記載のトランスジェニック植物。

【請求項4】 ストレス応答性プロモーターが、rd29A遺伝子プロモーター、rd29B遺伝子プロモーター、rd17遺伝子プロモーター、rd22遺伝子プロモーター、DREB1A遺伝子プロモーター、cor6.6遺伝子プロモーター、cor15a遺伝子プロモーター、erd1遺伝子プロモーター及びkin1遺伝子プロモーターからなる群から選択される少なくとも1つである請求項1～3のいずれか1項に記載のトランスジェニック植物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、乾燥ストレス応答性エレメント(DRE ; dehydration responsive element)に結合しDRE下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNAを、ストレス応答性プロモータ下流に連結した遺伝子が導入されたトランスジェニック植物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 植物は、自然界において、乾燥、高温、低温又は塩などの様々な環境ストレスに曝されて生息している。植物は、動物のように移動によってストレスから身を守る行動をとることができないため、進化の過程で、様々なストレス耐性機構を獲得してきた。例えば、低温耐性植物(シロイスナズナ、ホウレンソウ、レタス、エンドウ、オオムギ、テンサイなど)は、低温感受性植物(トウモロコシ、イネ、カボチャ、キュウリ、バ

ナ、トマトなど)よりも、生体膜脂質中の不飽和脂肪酸の含有割合が低く、そのため、低温に曝されても、生体膜脂質の相転移が起こりにくく、低温障害が生じにくい。

【0003】これまで、人為的に環境ストレス耐性植物を作出する場合、乾燥、低温又は塩耐性な系統の選抜や交配などの手法が用いられてきたが、選抜法には多くの時間が必要であり、一方、交配法は限られた種間にしか用いることができないため、高い環境ストレス耐性を有する植物の作出は困難であった。

【0004】近年のバイオテクノロジーの進歩に伴い、植物に異種生物由来の特定の遺伝子を導入するトランスジェニック技術などの手法を用いて、乾燥、低温、塩などに耐性の植物の作出が試みられている。これまでに、環境ストレス耐性植物の作出に用いられた遺伝子としては、浸透圧調節物質(マンニトール、プロリン、グリシンベタインなど)の合成酵素遺伝子や細胞膜脂質の修飾酵素遺伝子などが挙げられる。具体的には、マンニトール合成酵素遺伝子としては大腸菌由来マンニトール1-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子[Science 259:508-510(1993)]、プロリン合成酵素遺伝子としては豆由来 $\Delta^1$ -プロリン-5-カルボキシレートシンターゼ遺伝子[Plant Physiol. 108:1387-1394 (1995)]、グリシンベタイン合成酵素遺伝子としては細菌由来コリンデヒドロゲナーゼ遺伝子[Plant J. 12:1334-1342(1997)]、細胞膜脂質修飾遺伝子としてはシロイスナズナ由来 $\omega$ -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子[Plant Physiol. 105:601-605(1994)]やラン藻の $\Delta$ 9不飽和化酵素遺伝子[Nature Biotech. 14:1003-1006(1996)]が用いられている。しかし、これらの遺伝子の導入植物は、ストレス耐性度が不安定であったり、耐性レベルが低い等の問題から実用化に至ったものは存在しない。

【0005】さらに、乾燥、低温、又は塩ストレス耐性の獲得には、複数の遺伝子が働き、その結果、植物はストレス耐性になることが報告されている[Plant Physiol. 115:327-334(1997)]。そこで、ストレス耐性の獲得に関する複数の遺伝子の発現を同時に活性化することができる転写因子をコードする遺伝子が植物に導入され、ストレス耐性度の高い植物が作出されている[The Plant Cell, 10:1-17(1998)]。しかし、このように複数の遺伝子の発現を誘導する遺伝子を導入した場合、複数の遺伝子が同時期に活性化されるため、宿主植物のエネルギーは、該遺伝子産物の生成や、該遺伝子産物に起因する細胞内代謝に向けられ、宿主植物は、成長が遅れたり矮化してしまうことが多い。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、ストレス応答性プロモーターの下流に、ストレス応答性エレメントに結合し該エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNAが連結された遺伝子を含む、

環境ストレス(乾燥ストレス、低温ストレス、塩ストレスなど)に対する耐性が向上し且つ矮化の起こらないトランスジェニック植物を提供することを目的とする。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、乾燥、低温又は塩ストレス耐性の獲得に働く遺伝子を制御する新規な転写因子の遺伝子をクローニングし、植物にストレス応答性プロモーターの下流に連結した該遺伝子を導入することにより、乾燥、低温又は塩ストレス耐性が著しく向上し且つ矮化の起こらない植物を作出することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は、ストレス応答性プロモーターの下流に以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAが連結された遺伝子を含むトランスジェニック植物である。

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8若しくは配列番号10で表されるアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質

【0009】さらに、本発明は、ストレス応答性プロモーターの下流に以下の(c)又は(d)のDNAが連結された遺伝子を含むトランスジェニック植物である。

(c) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7若しくは配列番号9で表される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7若しくは配列番号9で表される塩基配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつストレス応答性エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNA

ストレスとしては、乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスが挙げられる。

【0010】さらに、ストレス応答性プロモーターとしては、rd29A遺伝子プロモーター、rd29B遺伝子プロモーター、rd17遺伝子プロモーター、rd22遺伝子プロモーター、DREB1A遺伝子プロモーター、cor6.6遺伝子プロモーター、cor15a遺伝子プロモーター、erd1遺伝子プロモーター及びkin1遺伝子プロモーターからなる群から選択される少なくとも1つが挙げられる。以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】本発明のトランスジェニック植物は、ストレス応答性プロモーターの下流に乾燥ストレス応答性エレメント(DRE; dehydration responsive element)に結合しDRE下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する転写因子をコードするDNA(DREB遺伝子という)が連結された遺伝子を導入することにより作出した、環境

ストレス耐性のトランスジェニック植物である。

【0012】本発明において用いられるDREB遺伝子は、以下のようにしてクローニングすることができる。なお、DREB遺伝子のうち、DRE結合タンパク質1A遺伝子をDREB1A遺伝子、DRE結合タンパク質1B遺伝子をDREB1B遺伝子、DRE結合タンパク質1C遺伝子をDREB1C遺伝子、DRE結合タンパク質2A遺伝子をDREB2A遺伝子、DRE結合タンパク質2B遺伝子をDREB2B遺伝子という。

#### 【0013】1. DREB遺伝子のクローニング

10 (1) シロイヌナズナのmRNA及びcDNAライブラリーの調製 mRNAの供給源としては、シロイヌナズナの葉、茎、根、花など植物体の一部又は植物体全体が挙げられる。また、シロイヌナズナの種子をGM培地、MS培地、#3培地などの固体培地に播種し、無菌条件下で生育させた植物体も用いることができる。DREB1A遺伝子のシロイヌナズナ植物体中のmRNAレベルは、植物体を低温ストレス(例えば、10~4°C)に曝露することにより増大し、DREB2A遺伝子のmRNAレベルは、植物体を塩ストレス(例えば、150~250mM NaCl)や乾燥ストレス(例えば、脱水状態にする)に曝露することにより増大するため、シロイヌナズナをこれらのストレスに曝露させた植物体を用いてもよい。

20 【0014】mRNAの調製は、例えば、GM培地で生育させたシロイヌナズナの植物体を、上記乾燥ストレス、低温ストレス又は塩ストレスに曝露後、液体窒素で凍結する。その後は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、凍結した植物体を乳鉢などで摩碎後、得られた摩碎物から、グリオキザール法、グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法、塩化リチウム-尿素法、プロテイナーゼK-デオキシリボヌクレアーゼ法などにより粗RNA画分を抽出調製する。次いで、この粗RNA画分から、オリゴdT<sub>20</sub>-セルロースやセファロース2Bを担体とするポリU-セファロースなどを用いたアフィニティカラム法、あるいはバッチ法によりポリ(A)<sup>+</sup>RNA(mRNA)を得ることができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法などによりmRNAをさらに分画してもよい。

30 【0015】このようにして得られたmRNAを鋳型として、市販のキット(例えば、ZAP-cDNA Synthesis Kit(STRATAGENE社製))を用い、オリゴdT<sub>20</sub>及び逆転写酵素によって一本鎖cDNAを合成した後、該一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する。次いで、得られた二本鎖cDNAにEcoRI-NotI-BamHIアダプターなどの適切なアダプターを付加後、転写活性化ドメイン(例えばGAL4活性化ドメインなど)を含むプラスミド(例えばpAD-GAL4プラスミド(Stratagene社製)など)の転写活性化ドメインの下流に連結することにより、cDNAライブラリーを作製することができる。

40 【0016】(2) DREB遺伝子のクローニング用宿主DREB遺伝子をクローニングする方法としては、酵母を用いるワンハイブリッドスクリーニング法を挙げることが

できる。該スクリーニング法によるスクリーニングは、市販のキット(例えばMATCHMAKERワンハイブリッドシステム(Clontech社製))を用いて行うことができる。

【0017】上記キットを用いて、DREB遺伝子をクローニングする場合、DREB遺伝子がコードするタンパク質(DREBタンパク質という)が結合するDREを含むDNA断片をキットに添付のプラスミドpHISi-1及びpLacZiに連結し、得られたプラスミドをキットに添付の酵母(Saccharomyces cerevisiae YM4271)に形質転換したクローニング用宿主酵母を作製することが必要である。

【0018】クローニング用宿主酵母は、HIS3最小プロモーターと呼ばれるプロモーターの作用でリーキー( leaky)に発現されるHIS3タンパク質の作用によりヒスチジンを合成することができるため、通常はヒスチジン非存在下でも生育可能である。しかし、ここでHIS3タンパク質をコードする遺伝子の発現に用いられているプロモーターは最低限の転写水準しか維持することのできない最小プロモーターであるため、細胞内に生成されるタンパク質は非常に微量である。従って、HIS3タンパク質の競合阻害剤である3-AT(3-アミノトリアゾール)存在下で前記宿主酵母を培養した場合、細胞内のHIS3タンパク質の機能は、濃度依存的に3-ATによって阻害され、ある濃度以上の3-AT存在下では、細胞内のHIS3タンパク質は機能することができなくなり、前記宿主酵母はヒスチジン非存在下で生育不能となる。同様に、lacZ遺伝子も、CY C1最小プロモーターと呼ばれる最小プロモーターの下流に存在し、細胞内に生成されるβ-ガラクトシダーゼは非常に微量である。従って、前記宿主酵母をX-gal含有プレートに播種した場合、出現したコロニーは、コロニー全体が青色になるほどのX-gal分解能は有さない。

【0019】しかし、前記宿主酵母中において、HIS3遺伝子上流のDRE及びlacZ遺伝子上流のDREに結合し、HIS3遺伝子及びlacZ遺伝子の転写を活性化する転写因子が発現されると、該宿主酵母は十分量の3-AT存在下でも生育可能となり、かつX-galは分解されコロニーは青色となる。ここで、乾燥ストレス応答性エレメント(DRE ; dehydration responsive element)は、乾燥ストレスや低温ストレスに曝露された場合に発現される遺伝子の上流に存在する9 bpの保存的な配列5'-TACCGACAT-3'からなるシス作動性のDNA領域をいう。

【0020】DREを含むDNA断片は、乾燥ストレス耐性遺伝子の1つであるrd29A遺伝子[Kazuko Yamaguchi-Shinozaki and Kazuo Shinozaki : The Plant Cell 6 : 251-264(1994)]のプロモーター領域(rd29A遺伝子の翻訳開始点から-215~-145の領域)を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCRともいう)を行い、増幅することにより得ることができる。ここでPCRに用いることができる鉄型DNAとしては、シロイヌナズナのゲノムDNAが挙げられる。またセンスプライマーとしては、5'-AAGCTTAAGCTTACATCAGTTGAAAG AAA-3' (配列番号11)、アンチセンスプライマーとして

は、5'-AAGCTTAAGCTTACATGTC-3' (配列番号12)を用いることができる。但し、本発明においてはこれらのプライマーに限定されるものではない。

【0021】(3) DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子のクローニング

DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子は、上記(1)において得られたcDNAライブラリーを、上記(2)において得られた宿主に、酢酸リチウム法などにより形質転換し、該形質転換体をX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド)及び3-AT(3-アミノトリアゾール)を含有するLB培地プレートなどに播種・培養後、該プレート上に出現した青色のコロニーからプラスミドを単離することにより得ることができる。

【0022】すなわち、DREB1A遺伝子又はDREB2A遺伝子を含むポジティブクローンは、GAL4活性化ドメイン(GAL4 AD)をコードするDNA領域とDRE結合タンパク質をコードする領域との融合遺伝子を保有し、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーターの制御下で、DRE結合タンパク質とGAL4転写活性化ドメインとの融合タンパク質(ハイブリッドタンパク質)を発現する。次いで、発現された融合タンパク質は、DRE結合タンパク質部分を介して、レポーター遺伝子上流のDREに結合し、次いでGAL4活性化ドメインがlacZ遺伝子及びHIS3遺伝子の転写を活性化する。それにより、ポジティブクローンは、著量のHIS3タンパク質及びβ-ガラクトシダーゼを生成する。従って、ポジティブクローンは、生成されたHIS3タンパク質の作用により3-AT存在下でもヒスチジンを合成することができるため3-AT存在下で生育可能となるとともに、生成されたβ-ガラクトシダーゼの作用による培地中のX-galの分解によりコロニーは青色を呈する。

【0023】次いで、このような青色コロニーからシングルセルアイソレーションを行った後、単離された細胞を培養し、得られる培養細胞からプラスミドDNAを精製することにより、DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子を得ることができる。

【0024】(4) DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質のホモローグ

生物は、1つの遺伝子から進化したと考えられる塩基配列の類似した遺伝子を有していることがある。そのような遺伝子がコードするタンパク質は、互いにホモローグといわれ、既に塩基配列が判明している遺伝子の一部をプローブとして、遺伝子ライブラリーの中からクローニングすることができる。従って、シロイヌナズナのcDNAライブラリーの中から、上記(3)において得られたDREB1AcDNA又はDREB2AcDNAをプローブとしてそれらのホモローグをコードする遺伝子をクローニングすることができる。

【0025】(5) 塩基配列の決定

上記(3)及び(4)において得られたプラスミドよりcDNA部分を制限酵素で切断し、pSK(Stratagene社製)などの適

切なプラスミドに連結してサブクローニングした後、塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキサム-ギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法などの公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機（例えばPERKIN-ELMER社製373A DNAシークエンサーなど）を用いて配列決定が行われる。

【0026】配列番号1にはDREB1A遺伝子の塩基配列を、配列番号2には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号3にはDREB2A遺伝子の塩基配列を、配列番号4には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号5にはDREB1B遺伝子の塩基配列を、配列番号6には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号7にはDREB1C遺伝子の塩基配列を、配列番号8には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。配列番号9にはDREB2B遺伝子の塩基配列を、配列番号10には該遺伝子のコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す。また、前記アミノ酸配列からなるタンパク質がDREに結合しDRE下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸に欠失、置換、付加などの変異が生じたタンパク質をコードする変異型遺伝子も本発明に用いることができる。

【0027】例えば、配列番号2、4、6、8又は10で表されるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～20個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号2、4、8又は10で表わされるアミノ酸配列に少なくとも1個、好ましくは1～20個程度、さらに好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2、4、8又は10で表わされるアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましくは1～160個程度、さらに好ましくは1～40個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したタンパク質をコードする遺伝子も、当該タンパク質がDREに結合しDRE下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する限り、本発明に用いることができる。

【0028】また、上記遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも、当該DNAがコードするタンパク質がDREに結合しDRE下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有する限り、本発明に用いることができる。ストリンジェントな条件とは、例えば、ホルムアミド濃度が30～50%、好ましくは50%であり、温度が37～50℃、好ましくは42℃での条件をいう。

【0029】なお、変異型遺伝子は、Kunkel法やGapped duplex法などの公知の手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K(TAKARA社製) やMutant-G(TAKARA社製) など）を用いて、あるいは、TAKARA社のLAPCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて作

製することができる。

【0030】一旦DREB遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は本遺伝子のcDNAないしゲノムDNAを錆型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、DREB遺伝子を得ることができる。

【0031】なお、DREB1A又はDREB2A遺伝子を含む組換えベクターは、大腸菌K-12株に導入され、DREB1A遺伝子を含む大腸菌は、識別表示DREB1A、寄託番号FERM P-16936として、DREB2A遺伝子を含む大腸菌は、識別表示DREB2A、寄託番号FERM P-16937として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成10年8月11日付けで寄託されている。

【0032】2. DREB遺伝子がコードするタンパク質のDRE結合能及び転写活性化能の測定

(1) DREB遺伝子がコードするタンパク質のDRE結合能の解析  
DREB遺伝子がコードするタンパク質(以下DREBタンパク質という)がコードするタンパク質のDREへの結合能は、該タンパク質とGSTとの融合タンパク質を用い、ゲルシフトアッセイ [Urao, T et al. : The Plant Cell 5:1529-1539(1993)] を行うことにより確かめることができる。ここで、DREB1Aタンパク質とGSTとの融合タンパク質は以下のようにして得ることができる。すなわち、まずDREB1A遺伝子をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子をコードするプラスミド(例えば、pGEX-4T-1ベクター(Pharmacia社製)など)中のGSTコード領域の下流にフレームを合わせて連結する。得られたプラスミドを大腸菌に形質転換後、誘導条件下で大腸菌培養し、得られた大腸菌細胞を超音波破碎機などで破碎する。次に破碎液から遠心により細胞破片を除去後、上清をグルタチオン-セファロースなどの担体を用いるアフィニティーカロマトグラフィーによって精製し、前記融合タンパク質を得ることができる。

【0033】ゲルシフトアッセイは、DNAとタンパク質との相互作用を調べる方法である。すなわち、<sup>32</sup>Pなどで標識したDREを含むDNA断片と前記融合タンパク質とを混合してインキュベーションした後、該混合物を電気泳動し、ゲルを乾燥する。次に、オートラジオグラムをとり、DNA断片とタンパク質との結合に起因する遅れて泳動されたバンドを検出する。本発明において、DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質がDRE配列に特異的に結合していることは、DRE配列に変異をえたDNA断片を用いた場合に、前記のバンドが検出されないことを明らかにすることにより確認することができる。

【0034】(2) DREB遺伝子がコードするタンパク質の転写活性化能の解析

DREB遺伝子がコードするタンパク質の転写活性化能は、シロイヌナズナのプロトプラストの系を用いるトランスアクチベーション実験法を用いることにより解析することにより

とができる。例えば、DREB1A cDNAをCaMV35Sプロモーターを含むpBI221プラスミド(Clontech社製)に連結し、エフェクタープラスミドを構築する。一方、上記1の(2)において得られるDREを含む71塩基のDNA領域を3カセット結合したDNA断片を、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子上流のTATAプロモーターのさらに上流に連結し、レポータープラスミドを構築する。次いでこの2種のプラスミドをシロイヌナズナのプロトプラストに導入した後、GUS活性を測定する。ここでDREB1Aタンパク質を同時に発現させることにより、GUS活性の上昇が見られれば、プロトプラスト内で発現したDREB1Aタンパク質が、DREの配列を介して転写を活性化していることがわかる。

【0035】本発明において、プロトプラストの調製及び該プロトプラストへのプラスミドDNAの導入は、Abelらの方法[Abel, S. et al. : Plant J. 5:421-427(1994)]により行うことができる。また、実験ごとのプラスミドDNAの導入効率の差による実験誤差を最小限にするため、上記2種のプラスミドとともに、CaMV35Sプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドをプロトプラストに導入し、ルスフェラーゼ活性に対する $\beta$ -グルクロニダーゼ活性を測定し、得られた測定値を転写活性化能の値とすることができる。 $\beta$ -グルクロニダーゼ活性は、Jeffersonらの方法[Jefferson, R. A. et al. : EMBO J. 83:8447-8451(1986)]により、ルシフェラーゼ活性はPicaGeneルシフェラーゼアッセイキット(Toyo-Ink社製)を用いることにより測定することができる。

【0036】3. トランスジェニック植物の作製  
遺伝子工学的手法を用いて、上記1.において得られた遺伝子を植物宿主に導入することにより、環境ストレス、特に、低温ストレス(凍結ストレスも含む)、乾燥ストレス、塩ストレスなどに対して抵抗性を有するトランスジェニック植物を作製することができる。遺伝子の植物宿主への導入方法としては、アグロバクテリウム感染法などの間接導入法や、パーティクルガン法、ポリエチレンギリコール法、リポソーム法、マイクロインジェクション法などの直接導入法などが挙げられる。アグロバクテリウム感染法を用いる場合、以下のようにしてトランスジェニック植物を作製ことができる。

【0037】(1) 植物導入用組換えベクターの作製及びアグロバクテリウムの形質転換

植物導入用組換えベクターは、前記1.において得られたDREB1A遺伝子、DREB1B遺伝子、DREB1C遺伝子、DREB2A遺伝子、又はDREB2B遺伝子を含むDNAを適当な制限酵素で切断後、必要に応じて適切なリンカーを連結し、植物細胞用のクローニングベクターに挿入することにより得ることができる。クローニング用ベクターとしては、pB12113Not、pBI2113、pBI101、pBI121、pGA482、pGAH、pBIG等のバイナリーベクター系のプラスミドやpLGV23Ne

o、pNCAT、pMON200などの中間ベクター系のプラスミドを用いることができる。

【0038】バイナリーベクター系プラスミドを用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列(LB, RB)間に、目的遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・チュメファシエンスC58、LBA4404、EH A101、C58C1Rif<sup>R</sup>、EHA105等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入し、該アグロバクテリウムを植物の形質導入用に用いる。

【0039】上記の方法以外にも、本発明においては、三者接合法[Nucleic Acids Research, 12:8711(1984)]によってDREB遺伝子を含む植物感染用アグロバクテリウムを調製することができる。すなわち、目的遺伝子を含むプラスミドを保有する大腸菌、ヘルパープラスミド(例えばpRK2013など)を保有する大腸菌、及びアグロバクテリウムを混合培養し、リファンピシリン及びカナマイシンを含む培地上で培養することにより植物感染用の接合体アグロバクテリウムを得ることができる。

【0040】DREB遺伝子は、転写を活性化するタンパク質をコードする遺伝子であるため、該遺伝子を導入した植物は、発現されたDREBタンパク質の作用で種々の遺伝子が活性化され、それに伴うエネルギー消費の増大や代謝の活性化により植物自身の生育が抑制される場合がある。これを防止するため、ストレス負荷時にのみDREB遺伝子が発現されるように、DREB遺伝子をストレス応答性プロモーターをDREB遺伝子上流に連結することが考えられる。例えば、そのようなプロモーターとしては、例えば以下のものが挙げられる。

【0041】rd29A遺伝子プロモーター[Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. : The Plant Cell, 6:251-264 (1994)]。

rd29B遺伝子プロモーター[Yamaguchi-Shinozaki, K. et al. : The Plant Cell, 6:251-264 (1994)]。

rd17遺伝子プロモーター[Iwasaki, T. et al. : Plant Physiol., 115:1287(1997)]。

rd22遺伝子プロモーター[Iwasaki, T. et al. : Mol. Gen. Genet., 247:391-398(1995)]。 DREB1A遺伝子プロモーター[Shinwari, Z. K. et al. : Biochem. Biophys. Res. Com. 250:161-170(1998)]。

【0042】cor6.6遺伝子プロモーター[Wang, H. et al. : Plant Mol. Biol. 28:619-634(1995)]。

cor15a遺伝子プロモーター[Baker, S. S. et al. : Plant Mol. Biol. 24:701-713(1994)]。

erd1遺伝子プロモーター[Nakashima K. et al. : Plant J. 12:851-861(1997)]。

kin1遺伝子プロモーター[Wang, H. et al. : Plant Mol. Biol. 28:605-617(1995)]。

【0043】但し、ストレス応答性であり、且つ植物体内で機能することが知られている限り、上記プロモータ

ーに限定されるものではない。なお、これらのプロモーターは、該プロモーターを含むDNAの塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いて、ゲノムDNAを錆型として、PCRによる增幅反応によって得ることができる。

【0044】また、必要に応じて転写終結を指令するターミネーターをDREB遺伝子の下流に連結することもできる。ターミネーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス由来やノパリン合成酵素遺伝子ターミネーターなどが挙げられる。但し、植物体内で機能することが知られているターミネーターであればこれに限定されるものではない。

【0045】また、必要に応じてプロモーター配列とDREB遺伝子の間に、遺伝子の発現を増強させる機能を持つイントロン配列、例えばトウモロコシのアルコールデヒドログナーゼ(Adh1)のイントロン[*Genes & Development* 1:1183-1200(1987)]を導入することができる。

【0046】さらに、効率的に目的の形質転換細胞を選択するために、有効な選択マーカー遺伝子をDREB遺伝子と併用することが好ましい。その際に使用する選択マーカーとしては、カナマイシン耐性遺伝子(NPTII)、抗生素質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(htp)遺伝子及びビアラホス(bialaphos)に対する抵抗性を付与するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ(bar)遺伝子等から選ばれる1つ以上の遺伝子を使用することができる。DREB遺伝子及び選択マーカー遺伝子は、単一のベクターと一緒に組み込んでも良いし、それぞれ別個のベクターに組み込んだ2種類の組換えDNAを用いてもよい。

【0047】(2) 植物宿主へのDREB遺伝子の導入  
本発明において、植物宿主とは、植物培養細胞、栽培植物の植物体全体、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、根茎、種子等)、又は植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)のいずれをも意味するものである。植物宿主として用いることができる植物としては、シロイスナズナ、タバコ、イネ、トウモロコシなどが挙げられる。DREB遺伝子は、採取した植物切片にDREB遺伝子を含むベクターをアグロバクテリウム感染法、ペティックルガン法、又はポリエチレンギリコール法などで、上記植物宿主に導入することができる。あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法によりDREB遺伝子を含むベクターを導入することもできる。

【0048】アグロバクテリウム感染法により遺伝子を導入する場合、目的の遺伝子を含むプラスミドを保有するアグロバクテリウムを植物宿主に感染させる工程が必要である。この工程は、バキュームインフィルトレーション法[CR Acad. Sci. Paris, Life Science, 316:1194(1993)]により行うことができる。すなわち、シロイスナズナをバーミキュライトとパーライトを等量ずつ合せた土で生育させたシロイスナズナに、DREB遺伝子を含

むプラスミドを含むアグロバクテリウムの培養液に直接シロイスナズナを浸し、これをデシケーターに入れバキュームポンプで65~70mmHgになるまで吸引後、5~10分間、室温に放置する。鉢をトレーに移しラップで覆い湿度を保つ。翌日ラップを取り、植物をそのまま生育させ種子を収穫する。

【0049】次いで、目的遺伝子保有個体を選択するために、様々な株由来の種子を適切な抗生物質を加えたMS寒天培地に播種する。この培地で生育したシロイスナズナを鉢に移し、生育させることにより、本発明に用いる遺伝子が導入されたトランスジェニック植物の種子を得ることができる。

【0050】一般に、植物に導入した遺伝子は、宿主植物のゲノム中に組み込まれるが、その場合、導入されるゲノム上での位置が異なることにより導入遺伝子の発現が異なるポジションイフェクトと呼ばれる現象が見られる。導入遺伝子がより強く発現している形質転換体は、導入遺伝子のDNA断片をプローブとして用いるノーザン法により宿主植物中に発現しているmRNAレベルを検定することによって選抜することができる。

【0051】本発明に用いる遺伝子を導入したトランスジェニック植物及びその次世代に目的の遺伝子が組み込まれていることの確認は、これらの細胞及び組織から常法に従ってDNAを抽出し、公知のPCR法又はサザン分析を用いて導入した遺伝子を検出することにより行うことができる。

【0052】(3) DREB遺伝子の植物組織での発現レベル及び発現部位の分析

DREB遺伝子を導入したトランスジェニック植物における30該遺伝子の発現レベル及び発現部位の分析は、これらの細胞及び組織から常法に従ってRNAを抽出し、公知のRT-PCR法又はノーザン分析を用いてDREB遺伝子のmRNAを検出することにより行うことができる。また、DREBタンパク質を、該タンパク質に対する抗体を用いたウエスタン分析等によって直接分析することもできる。

【0053】(4) DREB遺伝子が導入されたトランスジェニック植物体内における各種遺伝子のmRNAレベルの変化  
DREB遺伝子が導入されたトランスジェニック植物体内において、DREBタンパク質の作用により、発現レベルが40変化したと考えられる遺伝子はノーザン分析によって同定することができる。ノーザン分析においては、DREB遺伝子が導入されたトランスジェニック植物と導入されていない植物とを用いて、標的遺伝子と考えられる遺伝子のmRNAレベルを常法に従って、比較することによって検定することができる。

【0054】例えば、GM寒天培地などで育てた植物に、所定期間(例えば1~2週間)の乾燥及び/又は低温ストレスを与える。乾燥ストレスの負荷は、寒天培地から植物体を、抜き取り濾紙上で10分~24時間乾燥させることにより与えることができる。一方、低温ストレスの負

荷は、15～-4℃に10分～24時間保持することにより与えることができる。ストレスを与えないコントロール植物と乾燥及び低温ストレスを与えた植物から全RNAを調製して電気泳動を行い、ノーザン分析又はRT-PCRによって発現している遺伝子を検定する。

**【0055】(5) トランスジェニック植物の環境ストレスに対する耐性の評価**

DREB遺伝子を導入したトランスジェニック植物の環境ストレスに対する耐性は、バーミキュライト、パーライトなどを含む土を入れた植木鉢にトランスジェニック植物を植え、乾燥・低温・凍結などの各種ストレスを負荷した場合の生存を調べることによって評価することができる。例えば、乾燥ストレスに対する耐性は、2～4週間、水を与えずその生存を調べることにより、また凍結ストレスに対する耐性は、-6～-10℃に、5～10日間置いた後、5～10日間、20～25℃で生育させその生存率を調べることにより評価することができる。

**【0056】**

**【実施例】**以下に、本発明を実施例を示して具体的に説明するが、本発明に用いる範囲はこれらに限定されるものではない。

**【実施例1】DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子のクローニング**

(1) シロイスナズナ植物体の栽培

LEHLE SEEDSから入手したシロイスナズナの種子を滅菌液(1%次亜塩素酸ナトリウム、0.02%Triton X-100)に15分間浸漬することにより滅菌し、次いで滅菌水により水洗後、GM寒天培地(1リットル当り：ムラシゲ・スクレース30g、寒天8g、pH 5.7)に、40～120粒播種した。そして約1000lux、16時間明期、8時間暗期の光条件下において、22℃で栽培することにより植物体を得た。

**【0057】(2) ポリ(A)<sup>+</sup>RNAの調製**

上記(1)において得た植物体を、4℃で24時間の低温処理を行った後、グリオキザール法により全RNAを調製し\*

ポリ(A <sup>+</sup> )RNA	5 μl(5 μg)
10×第1鎖合成反応用緩衝液	5 μl
DEPC処理水	34 μl
40単位/μlリボスクリアーゼインヒビター	1 μl
第1鎖用スクレオチドミックス	3 μl
1.4 μg/μlリンクカープライマー	2 μl
	全量 50 μl

**【0062】**上記溶液に、逆転写酵素1.5 μl(50単位/μl)を添加して、37℃で、1時間インキュベートすることにより一本鎖cDNAを合成した。次に、得られた一本鎖cDNA

一本鎖cDNA反応液	45 μl
10×第2鎖合成用緩衝液	20 μl
第2鎖用NTPミックス	6 μl
1.5単位/μl RNase H	2 μl
9単位/μl DNAポリメラーゼI	11 μl
DEPC処理水	116 μl
	全量 200 μl

**【0064】**上記反応液を、16℃で2.5時間インキュベートすることにより二本鎖cDNAを合成した。合成した二

\*た。すなわち、液体窒素により凍結したシロイスナズナの植物体3 gを、100mlの5.5M GTC溶液(5.5Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム、0.5%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム)に懸濁し、ホモジエナイザーで素早く細胞を可溶化させた。このホモジエネートを、18-Gの注射針を取り付けた注射筒を用いて10回以上出し入れすることによりDNAを細断した後、4℃、12,000×gで15分間遠心し、細胞破片を沈殿させて除去した。

**【0058】**得られた上清をオートクレーブ済の遠心管に入れた17mlのCsTFA溶液(セシウムトリフルオロアセート(Pharmacia社製)、0.25M EDTA、滅菌水を混合してD=1.51に調整したもの)上に重層後、Beckmann SW28ローター中15℃、25,000×rpmで24時間超遠心しRNAを沈殿させた。次いで得られたRNAを、600 μl の4M GTC溶液(上記5.5M GTC溶液を滅菌水で希釈してGTC濃度が4Mとなるようにしたもの)に溶解しエタノール沈殿を行うことにより目的的全RNAを得た。

**【0059】**上記全RNAを、2 mlのTE/NaCl(TEと1M NaClを1:1の割合で混合したもの)に溶解し、既にTE/NaClで平衡化しておいたオリゴdTセルロースカラム(Collaborative research社製オリゴdTセルロース(type 3)をBio-Rad社製エコノカラム(直径0.6cm)に高さ1.5cmとなるよう詰めたもの)に通し、通過した溶液をもう一度カラムに通した。次いで、約8 mlのTE/NaClでカラムを洗浄後、TEを加えてポリ(A)<sup>+</sup>RNAを溶出・精製した。得られたRNAの量は、UV分光器により測定した。

**【0060】(3) cDNAライブラリーの合成**  
上記(2)により得られたポリ(A)<sup>+</sup>RNA 5 μgを用いて、cDNA合成キット(Stratagene社製)により二本鎖cDNAを合成後、該二本鎖cDNAをpAD-GAL4プラスミド(Stratagene社製)に連結しcDNAライブラリーを合成した。すなわち、まず、キットに添付のプロトコルに従い、以下の反応溶液中で一本鎖cDNAを合成した。

**【0061】**

5 μl(5 μg)
5 μl
34 μl
1 μl
3 μl
2 μl
全量 50 μl

※NAの反応液に、以下の試薬を順に加えた。

**【0063】**

一本鎖cDNA反応液	45 μl
10×第2鎖合成用緩衝液	20 μl
第2鎖用NTPミックス	6 μl
1.5単位/μl RNase H	2 μl
9単位/μl DNAポリメラーゼI	11 μl
DEPC処理水	116 μl
	全量 200 μl

本鎖cDNAを、Pfu DNAポリメラーゼ5単位を用い72℃で30分間インキュベートすることにより末端を平滑した。

次いで、フェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行った後、得られたペレットに9 μlのEcoRI-Not I-BamHIアダプター(TAKARA社製)、1 μlの10×リガーゼ緩衝液、1 μlのATP、1 μlのT4 DNAリガーゼ(4単位/μl)を加え、4℃で2日間インキュベートすることにより、二本鎖cDNAにアダプターを付加した。次いで、両端にEcoRI制限酵素部位を有するcDNAを、クローニングベクターであるpAD-GAL4プラスミド(Stratagene社製)のGA L4の活性化ドメインの下流のEcoRI部位に、T4DNAリガーゼを用いて連結することによりcDNAライブラリーを合成了。

#### 【0065】(4) ゲノムDNAの調製

上記(1)において得られた植物体から、Molecular Cloning[Maniatis, T. et al., Molecular Cloning:a Laboratory Manual, 187-198, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(1982)]に記載の方法に従って、ゲノムDNAを調製した。すなわち、シロイヌナズナ植物体50 gに2,000mlの破碎用緩衝液(0.35Mスクロース、1M Tris-HCl(pH8.0)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KC1)を加えて、ワーリングブレンダーで1分間の粉碎を3回行うことによりホモジナイズした。

【0066】摩碎液を濾過することにより、細胞残渣を除去し、濾液を遠心管に分注し、スイングローターで3,000×g、4℃で10分間低速遠心した。遠心後、上清を捨て沈殿を氷冷した30mlの破碎用緩衝液に懸濁してから再度低速遠心した。緑色の沈殿が白くなるまで同じ操作を3回繰り返した。

【0067】得られた白い沈殿を氷冷した10mlのTEに懸濁した後、10mlの溶解液(0.2M Tris-HCl(pH8.0)、50mM \*

ゲノムDNA溶液  
滅菌水  
10×PCR緩衝液(1.2M Tris-HCl(pH8.0)、100mM KC1、  
60mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1% Triton X-100、0.1mg/mlBSA)  
50pmol/μl プライマー(センス)  
50pmol/μl μMプライマー(アンチセンス)  
KOD DNAポリメラーゼ(Kod-101, TOYOB0社製)

\* EDTA、2%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム)を加えた。0.1mlのプロティナーゼK(10mg/ml)を加え細胞核を消化後、得られた消化液を、フェノール処理及びエタノール沈殿させた。次いで沈殿により得られるDNA纖維を3,000×g、5分間の遠心により回収し、これを1mlのTEに溶解してゲノムDNAを得た。

【0068】(5) 酵母ワンハイブリッドスクリーニングに用いる酵母宿主の構築

本発明に用いる転写因子をコードする遺伝子をクローニングするために、HIS3レポーター遺伝子又はlacZレポーター遺伝子の上流に、DREモチーフを含むDNA領域をそれぞれ4カセット連結した2種類のプラスミドを含む、DRE結合タンパク質遺伝子クローニング用宿主を構築した(図1)。すなわち、まず、本発明に用いる転写因子が結合するDRE配列を含む、rd29A遺伝子プロモーター領域(r d29A遺伝子の翻訳開始点から-215～-145の領域)をPCR法により増幅した。すなわち、センスプライマーとして、5'-AAGCTTAAGCTTACATCAGTTGAAAGAAA-3' (配列番号11)を、アンチセンスプライマーとして、5'-AAGCTTAAGCTTGC-3' (配列番号12)を合成した。ここで、これらのプライマーには、増幅後、PCR断片を容易にベクターに連結することができるよう、5'末端にHindIII切断部位を導入した。なお、これらの合成プライマーは、全自動DNA合成機(Perkin-Elmer社製)を使用して化学合成した。これらのプライマーを用い、上記(3)において調製したゲノムDNAを鉄型としてPCRを行った。PCRの反応液の組成は以下の通りである。

#### 【0069】

ゲノムDNA溶液	5 μl(100ng)
滅菌水	37 μl
10×PCR緩衝液(1.2M Tris-HCl(pH8.0)、100mM KC1、 60mM(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 、1% Triton X-100、0.1mg/mlBSA)	5 μl
50pmol/μl プライマー(センス)	1 μl(50pmol)
50pmol/μl μMプライマー(アンチセンス)	1 μl(50pmol)
KOD DNAポリメラーゼ(Kod-101, TOYOB0社製)	1 μl(2.5単位)
全量	50 μl

【0070】上記反応液を、よく混合後、ミネラルオイルを50 μl重層した。PCRは、98℃で15秒間の熱変性、65℃で2秒間のアニーリング、74℃で30秒間の伸長反応の条件を1サイクルとして、25サイクル行った。反応終了後、クロロホルム50 μlを加え混合し、4℃、15,000rpmで15分間遠心し、上層を新しいマイクロチューブに回収した。そこにエタノール100 μlを加えよく混合後、4℃、15,000rpmで15分間遠心しPCR産物をペレット化した。

【0071】得られたPCR産物をHindIIIで切断後ベクターp SKのHindIII部位に連結し、この組換えプラスミドを大腸菌に形質転換した。形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、塩基配列を決定することにより、4回同じ方向にDNA断片が結合されたものを選抜した。

【0072】これをEcoRIとHincIIで切り出した後、得

られたDNA断片を酵母の発現ベクターであるpHSi-1(Clontech社製)のHIS3最小プロモーター上流のEcoRI-MluI部位に連結した。また、同様に、DREを4カセット含むDNA断片をpSKからEcoRIとHincIIで切り出し、酵母の発現ベクターpLacZi (Clontech社製)のlacZ最小プロモーターの上流のEcoRI-SalI部位に連結した。得られた2種のプラスミドをSaccharomyces cerevisiae YM4271(MATA, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trpl-903) (Clontech社製)に形質転換することにより、酵母ワンハイブリッドスクリーニングに用いる酵母宿主を得た(図1)。

【0073】(6) DREB1A遺伝子及びDREB2A遺伝子のクローニング

上記(3)において調製したcDNAライブラリーを用いて1.2 × 10<sup>6</sup>の酵母の形質変換体をスクリーニングした。そ

の結果、2種のポジティブクローニングを得た。得られたcDNAをpAD-GAL4プラスミドからEcoRIを用いて切り出し、pSKプラスミドのEcoRI部位に結合して、組換えプラスミドpSKDREB1A及びpSKDREB2Aを得た。

#### 【0074】(7) 塩基配列の決定

このプラスミドpSKDREB1A及びpSKDREB2Aを用いて、得られたcDNAの全塩基配列を決定した。プラスミドpSKDREB1A及びpSKDREB2Aは、培養した大腸菌細胞中から自動プラスミド調製機(KURABO社製Model PI-100)によって調製した。塩基配列決定のための反応は、反応用ロボット(Perkin Elmer社製CATALYST 800)を用いて行った。塩基配列決定は、自動塩基配列決定機(Perkin Elmer社製Model 373A)を用いて行った。その結果、プラスミドpSKDREB1A中のcDNAは、933 bpの塩基から構成されており(配列番号1)、該塩基配列中には216アミノ酸残基からなる推定分子量約24.2キロダルトンのタンパク質(配列番号2)をコードする唯一のオープンリーディングフレームの存在することがわかった。一方プラスミドpSKDREB2AのcDNAは、1437bpの塩基から構成されており(配列番号3)、該塩基配列中には335アミノ酸残基からなる推定分子量約37.7キロダルトンのタンパク質(配列番号4)をコードする唯一のオープンリーディングフレームの存在することがわかった。

#### 【0075】(8) DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質のホモローグをコードする遺伝子の単離

上記(6)において得られたDREB1A遺伝子又はDREB2A遺伝子がコードするタンパク質のホモローグをコードする遺伝子を単離した。すなわち、上記(5)において得られたDREB1A遺伝子を含む二本鎖cDNA断片又はDREB2A遺伝子を含む二本鎖cDNA断片をプローブとして、Molecular Cloning[Sambrook, J et al., Molecular Cloning:a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10 Skyline Drive Plainview, NY(1989)]に記載の方法に従い、シロイスナズナの $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーから、ホモローグをコードする遺伝子を単離した。DREB1Aタンパク質のホモローグをコードする遺伝子として、DREB1B遺伝子及びDREB1C遺伝子を、DREB2Aタンパク質のホモローグをコードする遺伝子としてDREB2B遺伝子を得た。塩基配列決定したところ、DREB1B遺伝子(配列番号5)はCBF1と呼ばれる遺伝子[Stockinger, E. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1035-1040(1997)]と同一であったが、DREB1C遺伝子(配列番号7)、DREB2B遺伝子(配列番号9)は新規であった。

【0076】オープンリーディングフレームの解析からDREB1C遺伝子がコードする遺伝子産物は216アミノ酸残基よりなる分子量約24.3キロダルトンのタンパク質(配列番号8)であり、DREB2B遺伝子がコードする遺伝子産物は330アミノ酸残基よりなる分子量約37.1キロダルトンのタンパク質(配列番号10)であった。

#### 【0077】【実施例2】DREB1Aタンパク質及びDREB2A

#### タンパク質のDREへの結合能の解析

DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDREへの結合能を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と該タンパク質との融合タンパク質を大腸菌を用いて調製し、グルシフトアッセイにより調べた。DREB1AcDNAの塩基配列の119番目から547番目の429塩基のDNA断片又はDREB2AcDNAの塩基配列の167番目から666番目の500塩基のDNA断片をPCRによって增幅後、該增幅断片をプラスミドpGEX-4T-1(ファルマシア)のEcoRI-SalI部位に結合した。

10 これを大腸菌JM109に導入したのち、大腸菌を200 mlの2x YT培地(Molecular Cloning (1982) Cold Spring Harbor Laboratory Press)で培養して、これにプラスミドpGEX-4T-1中のプロモーターを活性化させる1 mMのイソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトシドを加え、DREB1Aタンパク質とGSTとの融合タンパク質の合成を誘導した。

【0078】タンパク質を行った大腸菌を、13 mlの緩衝液(10 mM Tris-HCl, 0.1 mM DTT, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)に懸濁した後、1% Triton X-100と1 mM EDTAを加え、細胞を超音波で破壊した。得られた

20 細胞破碎物を、22,000×gで20分間遠心し、グルタチオン-セファロース(Pharmacia製)を担体とするアフィニティークロマトグラフィーによってDREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質とGSTとの融合タンパク質を精製した。次に、融合タンパク質を、PCRによって調製したDRE配列を含む71塩基のDNA断片プローブとともに( $^{32}$ Pで放射能標識したもの)室温で20分間インキュベートした。

これを0.25xTris-borate-EDTAを含む6%アクリルアミドを用いて、100Vで2時間の電気泳動を行った。電気泳動後のゲルについてのオートラジオグラムの結果を図230に示した。この図からも明らかなように、融合タンパク質をDRE配列を含む71塩基のDNA断片プローブ(配列番号18)とともにインキュベートしたものは、遅れて泳動するバンドが検出された。また、DRE配列に変異を加えたDNA断片(配列番号19、配列番号20、配列番号21)をプローブとして用いた場合はこのバンドは検出されず、一方DRE配列の外に変異を加えたDNA断片(配列番号22、配列番号23)をプローブとして用いた場合には、バンドが検出された。このことから、DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質がDRE配列に特異的に結合していることわかった。

40 【0079】【実施例3】DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDRE下流遺伝子の転写活性化能の解析  
DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質が、植物細胞内におけるDRE依存的な転写をトランスに活性化し得るかどうかを調べるために、シロイスナズナの葉から調製したプロトプラストの系を用いて、トランスアクチベーション実験を行った。すなわち、まず、DREB1A又はDREB2AのcDNAをCaMV35Sプロモーターを含むpBI221プラスミドに連結することによりエフェクタープラスミドを構築した。レポータープラスミドを得るために、DREの配列を含

む71塩基の配列を三個結合したDNA断片をrd29A遺伝子の最小限のTATAプロモーターと $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子に結合した。この2種のエフェクタープラスミドとレポータープラスミドとをシロイヌナズナのプロトプラストに導入したのち、GUS活性を測定した。DREB1Aタンパク質又はDREB2Aタンパク質を同時に発現させるとGUS活性の上昇が見られ、DREB1Aタンパク質はDREの配列を介して転写を活性化している転写因子であることが示された(図3)。

**【0080】**〔実施例4〕CaMV35Sプロモーターの下流にDREB1A遺伝子をコードするDNAを連結した遺伝子を含むトランスジェニック植物の作製

(1) 植物プラスミドの構築

上記のようにして得られたpSKDREB1A(10 $\mu$ g)を、10mM TrisHCl(pH7.5)/10mM MgCl<sub>2</sub>/1mMジチオスレイトール/100 mM NaCl中、EcoRV(20ユニット)とSmaI(20ユニット)を用いて37°Cで2時間切断し、DREB1A遺伝子を含む約0.9 kbのDNA断片を得た。一方、プロモーターDNAを持つプラスミドpBI2113Not(10 $\mu$ g)を、10 mM TrisHCl (pH7.5)/10mM MgCl<sub>2</sub>/1mMジチオスレイトール(DTT)/100 mM NaCl中、SmaIを用いて37°Cで2時間切断した。DREB1A遺伝子を含む0.9kbの前記DNA断片とpBI2113Notとを、66 mM TrisHCl (pH7.6)/6.6 mM MgCl<sub>2</sub>/10 mM DTT/0.1 mM ATP中、T4DNAリガーゼ(2ユニット)を用いて、15°Cで16時間反応させることにより連結し、得られた連結物を大腸菌JM109に形質転換した。得られた形質転換体を培養後、該培養物からプラスミドpBI35S:DREB1Aを精製した(図4)。次に塩基配列の決定を行いDREB1A遺伝子がセンス方向に結合したものを見抜した。ここで、pBI2113Notプラスミドは、pBI2113プラスミド[Plant Cell Physiology 37:49-59(1996)]をSmaIとSacIで切削して、GUS遺伝子のコード領域を取り除き、これにSmaI-NotI-SacIボリリンカーブを結合することにより調製した。

**【0081】**(2) 植物プラスミドpBI35S:DREB1Aを含む接合体アグロバクテリウムの調製

上記(1)において得られた植物プラスミドpBI35S:DREB1Aを持つ大腸菌DH5a、ヘルパープラスミドpRK2013を持つ大腸菌HB101及びアグロバクテリウムC58をLB培地を用いて28°CでLB寒天培地上で24時間混合培養した。生育したコロニーを1 mlのLB培地にかきとり懸濁した。この懸濁液10mlをリファンピシン100 $\mu$ g/ml、及びカナマイシン20 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に塗り、28°Cで2日間培養して、接合体アグロバクテリウムC58(pBI35S:DREB1A)を得た。

**【0082】**(3) アグロバクテリウム感染法によるシロイヌナズナへの遺伝子導入

この接合体をリファンピシン100 $\mu$ g/ml、及びカナマイシン20 $\mu$ g/mlを含むLB培地(10 ml)中28°Cで24時間培養した。さらに、この培養液を500 mlのLB培地に加えて24時間培養した。この培養液を遠心して培地を除

き、さらに250 mlのLB培地に懸濁した。

**【0083】**一方、バーミキュライトとパーライトとを等量ずつ合わせた土を入れた9 cmの植木鉢で4から5本のシロイヌナズナを6週間育てた。プラスミドpBI35S:DREB1Aを含むアグロバクテリウムのLB培養液に直接上記のシロイヌナズナを浸して、これをデシケーターに入れバキュームポンプで650mmHgになるまで吸引後、そのまま10分放置した。鉢をトレーに移しラップで覆い湿度を保った。翌日ラップを取り、植物をそのまま生育させ種子を得た。種子は次亜塩素酸ナトリウム水溶液で滅菌後、選択用のMS培地にバンコマイシン100 $\mu$ g/ml、カナマイシン30 $\mu$ g/mlを加えた寒天培地に蒔いた。この培地で生育したシロイヌナズナを鉢に移し形質転換植物体の種子を得た。

**【0084】**(4) 導入遺伝子と導入遺伝子がコードする転写因子が発現を変化させた遺伝子の同定  
形質転換体の導入遺伝子DREB1Aと導入遺伝子が発現を変化させたと考えられる遺伝子のmRNAレベルをノーザン分析により調べた。すなわち、DREB1A遺伝子、rd29A遺伝子、kin1遺伝子、cor6.6遺伝子、cor6.6遺伝子、cor15a遺伝子、rd17遺伝子、erd10遺伝子、P5CS遺伝子、erd1遺伝子、rd22遺伝子、rd29B遺伝子の部分断片をプローブとして。ノーザン分析にはシロイヌナズナの形質転換体の他に形質転換していない植物を用いて遺伝子の発現を比較することで検定した。2 gの3週間GM寒天培地で育てた植物に乾燥及び低温ストレスを与えた。乾燥ストレスについては寒天培地から抜き取り濾紙上で5時間乾燥させた。低温ストレスについては植物体を4°Cに5時間保温した。ストレスを与えないコントロールの植物と上記乾燥と低温ストレスを与えた植物から全RNAを調製して、電気泳動を行いノーザン法で発現している遺伝子を検定した。一般に、形質転換体においては遺伝子は同様にゲノムに導入されるが、その導入場所が異なることから、導入遺伝子の発現が異なるポジションイフェクトと呼ばれる現象が見られる。プローブとして導入遺伝子のDNA断片を用い、ノーザン法で検定することより導入遺伝子が強く発現している形質転換体を選抜した。また、プローブとして上記のストレス耐性に関与している可能性のある遺伝子のDNA断片を用い、DREB1A遺伝子を導入することでmRNAレベルの変化した遺伝子を同定した(図5)。

**【0085】**(5) 乾燥・凍結ストレスに対する耐性の発現

3週間バーミキュライトとパーライトを等量ずつ合わせた土を入れた9 cmの植木鉢で育てたシロイヌナズナの形質転換体を用いて乾燥・凍結耐性に関して検討した。形質転換体とコントロールとしてDREB1A遺伝子を含まないpBI121を形質転換したシロイヌナズナを用いて乾燥ストレスに対する耐性、凍結ストレスに対する耐性を検討した。乾燥ストレスに対する耐性の検討では2週間水を止

めその生存を調べた。また凍結耐性では $-6^{\circ}\text{C}$ に2日間置いた後5日間 $22^{\circ}\text{C}$ で生育させその生存率を調べた。

【0086】その結果、コントールではすべての植物が枯れてしまったが、DREB1A遺伝子を導入したトランスジェニック植物では高い生存率を示した(図6)。しかし、これらのトランスジェニック植物においては成長の抑制及び矮化が見られた。

【0087】[実施例5] rd29A遺伝子プロモーターの下流にDREB1A遺伝子をコードするDNAを連結した遺伝子を含むトランスジェニック植物の作製

(1) rd29A遺伝子プロモーターを含むpBI29APNotベクターの構築

両端にHindIII部位を結合したrd29Aプロモーター領域(r d29A遺伝子の翻訳開始点から-861～+63の領域)を以下のプライマーを用い、実施例2の(4)と同条件でPCR法にて作出了した(配列番号17)。用いたプライマーの塩基配列は5'-AAGCTTAAGCTGCCATAGATGCAATTCAATC-3' (配列番号13)と5'-AAGCTTAAGCTTCCAAAGATTTTCTTCCAA-3' (配列番号14)であった。PCRで得られたDNA断片はHindIIIで切断後、植物のバイナリーベクターであるpBI101 (Clontech, Palo Alto, CA, USA)のHindIII部位に結合した。pBI101は $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子がコードされているのでこれをSmaIとSacIで切断してSmaI-NotI-SacIポリリンカーで結合した。これを大腸菌DH5αに導入してプラスミドpBI29APNotを調製した。

【0088】(2) rd29A遺伝子プロモーターを用いた植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aの構築  
DREB1A遺伝子は、実施例1において得られたpSKDREB1Aを鋳型として、PCR法により増幅した。すなわち、センスプライマーとして、5'-GGATCCGGATCCATGAACTCATTCTGCT-3' (配列番号15)を、アンチセンスプライマーとして、5'-GGATCCGGATCCTAAACTCCATAACGATA-3' (配列番号16)を合成した。ここで、これらのプライマーには、増幅後、PCR断片を容易にベクターに連結することができるよう、5'末端にBamHI切断部位を導入した。このPCR産物を1%アガロースゲル電気泳動に供試し、900～1000bp付近の大きさのPCR産物をゲルから切り出した。このゲル断片を新しいマイクロチューブに移した後、67°Cに10分間保持することによりゲルを溶解した。得られたゲル溶解物に等容量のTEを加えよく混合した後、フェノール抽出した。さらに得られた抽出物を1,600×gで3分間遠心後、水層を再びフェノール抽出、フェノール／クロロホルム抽出し、水層に冷エタノールを加えエタノール沈殿しPCR産物を得た。

【0089】得られたPCR産物 $10\mu\text{g}$ を、 $30\mu\text{l}$ のTEに溶解し、これをBamHI(20ユニット)で切断した。 $70^{\circ}\text{C}$ で1時間加温して、BamHIを失活させた後、フェノール抽出、エタノール沈殿によりDREB1A遺伝子を含むDNA断片を回収した。次いで、このDNA断片を、ベクターpBI29APNotのBamHI部位に連結し、この組換えプラスミドを大腸菌

(DH5 $\alpha$ 株)に形質転換後、形質転換体をカナマイシン耐性により選択し、得られた形質転換体をLB培地で培養後、抽出精製することにより植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aを得た(図7)。

【0090】(4) 植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aを含む接合体アグロバクテリウムの調製  
上記(3)において得られた組換えプラスミドpBI29AP:DREB1Aを用いて、実施例5(2)と同様の手順により植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aを含む接合体アグロバクテリウムを調製した。

(5) アグロバクテリウム感染法によるシロイヌナズナへの遺伝子導入

上記(4)において得られた接合体アグロバクテリウムを用いて、実施例5(3)と同様の手順により植物プラスミドpBI29AP:DREB1Aをシロイヌナズナに導入した。

【0091】(6) 形質転換体の成長及び乾燥・凍結・塩ストレス耐性的観察

上記(5)において得られたrd29A遺伝子プロモーター下流にDREB1A遺伝子を連結したプラスミドを導入したシロイヌナズナのトランスジェニック植物体、実施例5において得られたCaMV35S遺伝子プロモーター下流にDREB1A遺伝子を連結したプラスミドを導入した得られたシロイヌナズナのトランスジェニック植物体、及びコントロールとして形質転換していない植物体を同一条件下で栽培し、成長及び乾燥・凍結・塩ストレス負荷後の生存率を調べた。すなわち、バーミキュライト及びパーライトを等量ずつ合わせた土を入れた9cmの植木鉢に各植物体を植え露地栽培した。図8は栽培を始めてから35日目(図8A及び図9A)と65日目(図8B及び図9B)の成長を示す植物体の写真である。PBI35S:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物では株によって成長の度合いに差が見られるが、成長に大きな阻害が見られた(図8A及び図8B)。これに対してpBI29AP:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物ではほとんど成長に阻害が見られなかった(図9A及び図9B)。

【0092】次に、ストレスに対する耐性度を調べた。すなわち、乾燥ストレスに対する耐性の検討では2週間水を与えなかった場合の生存、凍結ストレスに対する耐性では $-6^{\circ}\text{C}$ に2日間置いた後5日間 $22^{\circ}\text{C}$ で生育させた場合の生存、塩ストレスに対する耐性は600mM NaClに2時間浸した後、鉢に移し3週間生育させた場合の生存を調べた。その結果、図10及び表1～3のように、乾燥又は凍結ストレスを与えたコントロールの植物はすべて枯れた。塩ストレスを与えたコントロールの植物も生存するものはわずかであった。pBI35S:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物では株によってその生存率に差が見られ、導入したDREB1A遺伝子の発現が強い植物ほど耐性度が高かった。これに対してpBI29AP:DREB1Aを導入した形質転換体では43種を解析したが耐性度はほとんど同じであり、pBI35S:DREB1Aを導入した形質転換体よりも

高い生存率を示した。このように、本発明により作出し  
た植物は、高いレベルの乾燥・凍結・塩耐性を有し且つ\* 【0093】

表1 凍結ストレス負荷後のトランスジェニック植物の生存率

	生存個体数	全個体数	生存率(%)
rd29A:DREB1A	143	144	99.3
35S:DREB1Ab	47	56	83.9
35S:DREB1Ac	15	42	35.7
野生株	0	55	0.0

【0094】

表2 乾燥ストレス負荷後のトランスジェニック植物の生存率

	生存個体数	全個体数	生存率(%)
rd29A:DREB1A	52	80	65.0
35S:DREB1Ab	15	35	42.9
35S:DREB1Ac	6	28	21.4
野生株	0	25	0.0

【0095】

表3 塩ストレス負荷後のトランスジェニック植物の生存率

	生存個体数	全個体数	生存率(%)
rd29A:DREB1A	119	149	79.9
35S:DREB1Ab	4	24	16.7
野生株	4	29	13.8

【0096】

【発明の効果】本発明により、ストレス応答性プロモーターの下流に、ストレス応答性エレメントに結合し該エレメント下流の遺伝子の転写を制御するタンパク質をコードするDNAが連結された遺伝子を含む、環境ストレス

\*(乾燥ストレス、低温ストレス、塩ストレスなど)に対する耐性が向上し且つ矮化の起こらないトランスジェニック植物が提供される。

【0097】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Nobuyoshi Maeno, Director General, Japan International Research Center for Agricultural Sciences ; Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

&lt;120&gt; Environmental Stress-resistant Plant

&lt;160&gt; 23

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 933

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (119)..(766)

&lt;400&gt; 1

```
cctgaactag aacagaaaaga gagagaaaact attatttca gaaaccatac caacaaaaaa 60
gacagagatc ttttagttac cttatccagt ttcttgaaac agagtactct tctgatca 118
atg aac tca ttt tct gct ttt tct gaa atg ttt ggc tcc gat tac gag 166
Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu
```

(14)

特開 2000-116260

25

26

tct tcg gtt tcc tca ggc ggt gat tat att ccg acg ctt gcg agc agc Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Pro Thr Leu Ala Ser Ser	214
20 25 30	
tgc ccc aag aaa ccg gcg ggt cgt aag aag ttt cgt gag act cgt cac Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His	262
35 40 45	
cca ata tac aga gga gtt cgt cgg aga aac tcc ggt aag tgg gtt tgt Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Cys	310
50 55 60	
gag gtt aga gaa cca aac aag aaa aca agg att tgg ctc gga aca ttt Glu Val Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe	358
65 70 75 80	
caa acc gct gag atg gca gct cga gct cac gac gtt gcc gct tta gcc Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala	406
85 90 95	
ctt cgt ggc cga tca gcc tgt ctc aat ttc gct gac tcg gct tgg aga Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg	454
100 105 110	
ctc cga atc ccg gaa tca act tgc gct aag gac atc caa aag gcg gcg Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala	502
115 120 125	
gct gaa gct gcg ttg gcg ttt cag gat gag atg tgt gat gcg acg acg Ala Glu Ala Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Met Cys Asp Ala Thr Thr	550
130 135 140	
gat cat ggc ttc gac atg gag gag acg ttg gtg gag gct att tac acg Asp His Gly Phe Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr Thr	598
145 150 155 160	
gcg gaa cag agc gaa aat gcg ttt tat atg cac gat gag gcg atg ttt Ala Glu Gln Ser Glu Asn Ala Phe Tyr Met His Asp Glu Ala Met Phe	646
165 170 175	
gag atg ccg agt ttg ttg gct aat atg gca gaa ggg atg ctt ttg ccg Glu Met Pro Ser Leu Leu Ala Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro	694
180 185 190	
ctt ccg tcc gta cag tgg aat cat aat cat gaa gtc gac ggc gat gat Leu Pro Ser Val Gln Trp Asn His Asn His Glu Val Asp Gly Asp Asp	742
195 200 205	
gac gac gta tcg tta tgg agt tat taaaactcg attattatccatTTTtag Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr	796
210 215	
tacgatactt ttatTTTtat tattatTTTtat agatcCTTTttagaatggatctTCATTA aaaaaaa aaaaaaaa	856
aaaaaaa aaaaaaaa	916
	933

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 216

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 2

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu

(15)

特開 2000-116260

27

28

1	5	10	15
Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ile Pro Thr Leu Ala Ser Ser			
20	25	30	
Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His			
35	40	45	
Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Arg Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Cys			
50	55	60	
Glu Val Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe			
65	70	75	80
Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala			
85	90	95	
Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg			
100	105	110	
Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala			
115	120	125	
Ala Glu Ala Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Met Cys Asp Ala Thr Thr			
130	135	140	
Asp His Gly Phe Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr Thr			
145	150	155	160
Ala Glu Gln Ser Glu Asn Ala Phe Tyr Met His Asp Glu Ala Met Phe			
165	170	175	
Glu Met Pro Ser Leu Leu Ala Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro			
180	185	190	
Leu Pro Ser Val Gln Trp Asn His Asn His Glu Val Asp Gly Asp Asp			
195	200	205	
Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr			
210	215		

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1437

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (167)..(1171)

&lt;400&gt; 3

gctgtctgat	aaaaagaaga	ggaaaaactcg	aaaaagctac	acacaagaag	aagaagaaaa	60										
gatacgagca	agaagactaa	acacgaaagc	gatttatcaa	ctcgaaggaa	gagactttga	120										
ttttcaaatt	tcgtccccta	tagatttgt	tgttctggg	aaggag	atg gca gtt	175										
					Met Ala Val											
				1												
tat	gat	cag	agt	gga	gat	aga	aac	aca	caa	att	gat	aca	tcg	agg	223	
Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Asp	Arg	Asn	Arg	Thr	Gln	Ile	Asp	Thr	Ser	Arg	
5	10	15														
aaa	agg	aaa	tct	aga	agt	aga	ggt	gac	ggt	act	act	gtg	gct	gag	aga	271
Lys	Arg	Lys	Ser	Arg	Ser	Arg	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Val	Ala	Glu	Arg	
20	25	30														
tta	aag	aga	tgg	aaa	gag	tat	aac	gag	acc	gta	gaa	gtt	tct	acc	319	

29

30

Leu Lys Arg Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Thr Val Glu Glu Val Ser Thr		
40	45	50
aag aag agg aaa gta cct gcg aaa ggg tcg aag aag ggt tgt atg aaa		367
Lys Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly Cys Met Lys		
55	60	65
ggt aaa gga gga cca gag aat agc cga tgt agt ttc aga gga gtt agg		415
Gly Lys Gly Gly Pro Glu Asn Ser Arg Cys Ser Phe Arg Gly Val Arg		
70	75	80
caa agg att tgg ggt aaa tgg gtt gct gag atc aga gag cct aat cga		463
Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro Asn Arg		
85	90	95
ggt agc agg ctt tgg ctt ggt act ttc cct act gct caa gaa gct gct		511
Gly Ser Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Gln Glu Ala Ala		
100	105	110
tct gct tat gat gag gct gct aaa gct atg tat ggt cct ttg gct cgt		559
Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Lys Ala Met Tyr Gly Pro Leu Ala Arg		
120	125	130
ctt aat ttc cct cgg tct gat gcg tct gag gtt acg agt acc tca agt		607
Leu Asn Phe Pro Arg Ser Asp Ala Ser Glu Val Thr Ser Thr Ser		
135	140	145
cag tct gag gtg tgt act gtt gag act cct ggt tgt gtt cat gtg aaa		655
Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Thr Pro Gly Cys Val His Val Lys		
150	155	160
aca gag gat cca gat tgt gaa tct aaa ccc ttc tcc ggt gga gtg gag		703
Thr Glu Asp Pro Asp Cys Glu Ser Lys Pro Phe Ser Gly Gly Val Glu		
165	170	175
ccg atg tat tgt ctg gag aat ggt gcg gaa gag atg aag aga ggt gtt		751
Pro Met Tyr Cys Leu Glu Asn Gly Ala Glu Glu Met Lys Arg Gly Val		
180	185	190
aaa gcg gat aag cat tgg ctg agc gag ttt gaa cat aac tat tgg agt		799
Lys Ala Asp Lys His Trp Leu Ser Glu Phe Glu His Asn Tyr Trp Ser		
200	205	210
gat att ctg aaa gag aaa gag aac cag aag gag caa ggg att gta gaa		847
Asp Ile Leu Lys Glu Lys Lys Gln Lys Glu Gln Gln Ile Val Glu		
215	220	225
acc tgt cag caa caa cag cag gat tcg cta tct gtt gca gac tat ggt		895
Thr Cys Gln Gln Gln Gln Asp Ser Leu Ser Val Ala Asp Tyr Gly		
230	235	240
tgg ccc aat gat gtg gat cag agt cac ttg gat tct tca gac atg ttt		943
Trp Pro Asn Asp Val Asp Gln Ser His Leu Asp Ser Ser Asp Met Phe		
245	250	255
gat gtc gat gag ctt cta cgt gac cta aat ggc gac gat gtg ttt gca		991
Asp Val Asp Glu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Gly Asp Asp Val Phe Ala		
260	265	270
ggc tta aat cag gac cgg tac ccg ggg aac agt gtt gcc aac ggt tca		1039
Gly Leu Asn Gln Asp Arg Tyr Pro Gly Asn Ser Val Ala Asn Gly Ser		
280	285	290
tac agg ccc gag agt caa caa agt ggt ttt gat ccg cta caa agc ctc		1087
Tyr Arg Pro Glu Ser Gln Gln Ser Gly Phe Asp Pro Leu Gln Ser Leu		
295	300	305

(17)

特開 2 0 0 0 - 1 1 6 2 6 0

31

32

aac tac gga ata cct ccg ttt cag ctc gag gga aag gat ggt aat gga 1135

Asn Tyr Gly Ile Pro Pro Phe Gln Leu Glu Gly Lys Asp Gly Asn Gly

310

315

320

ttc ttc gac gac ttg agt tac ttg gat ctg gag aac taaacaaaac 1181

Phe Phe Asp Asp Leu Ser Tyr Leu Asp Leu Glu Asn

325

330

335

aatatgaagc ttttgatt tgatattgc ctaatccca caacgactgt tgattctcta 1241

tccgagttt agtgatatacg agaactacag aacacgttt ttcttggat aaagggtgaac 1301

tgttatatac gaaacagtga tatgacaata gagaagacaa ctatagttt ttagtctgct 1361

tctttaatg tggcttttag atatgtttt tggttgtaa caacaggaat gaataataca 1421

cacttgtaaa aaaaaa 1437

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 335

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 4

Met Ala Val Tyr Asp Gln Ser Gly Asp Arg Asn Arg Thr Gln Ile Asp

1

5

10

15

Thr Ser Arg Lys Arg Lys Ser Arg Ser Arg Gly Asp Gly Thr Thr Val

20

25

30

Ala Glu Arg Leu Lys Arg Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Thr Val Glu Glu

35

40

45

Val Ser Thr Lys Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly

50

55

60

Cys Met Lys Gly Lys Gly Pro Glu Asn Ser Arg Cys Ser Phe Arg

65

70

75

80

Gly Val Arg Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu

85

90

95

Pro Asn Arg Gly Ser Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Gln

100

105

110

Glu Ala Ala Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Lys Ala Met Tyr Gly Pro

115

120

125

Leu Ala Arg Leu Asn Phe Pro Arg Ser Asp Ala Ser Glu Val Thr Ser

130

135

140

Thr Ser Ser Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Thr Pro Gly Cys Val

145

150

155

160

His Val Lys Thr Glu Asp Pro Asp Cys Glu Ser Lys Pro Phe Ser Gly

165

170

175

Gly Val Glu Pro Met Tyr Cys Leu Glu Asn Gly Ala Glu Glu Met Lys

180

185

190

Arg Gly Val Lys Ala Asp Lys His Trp Leu Ser Glu Phe Glu His Asn

195

200

205

Tyr Trp Ser Asp Ile Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Lys Glu Gln Gly

210

215

220

Ile Val Glu Thr Cys Gln Gln Gln Gln Asp Ser Leu Ser Val Ala

225

230

235

240

Asp Tyr Gly Trp Pro Asn Asp Val Asp Gln Ser His Leu Asp Ser Ser

245

250

255

(18)

特開 2000-116260

33

34

Asp Met Phe Asp Val Asp Glu Leu Leu Arg Asp Leu Asn Gly Asp Asp		
260	265	270
Val Phe Ala Gly Leu Asn Gln Asp Arg Tyr Pro Gly Asn Ser Val Ala		
275	280	285
Asn Gly Ser Tyr Arg Pro Glu Ser Gln Gln Ser Gly Phe Asp Pro Leu		
290	295	300
Gln Ser Leu Asn Tyr Gly Ile Pro Pro Phe Gln Leu Glu Gly Lys Asp		
305	310	315
Gly Asn Gly Phe Phe Asp Asp Leu Ser Tyr Leu Asp Leu Glu Asn		
325	330	335

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 937

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (164)..(802)

&lt;400&gt; 5

cttggaaaag aatctacctg aaaagaaaaaa aaagagagag agatataaat agctttacca	60
agacagatat actatcttt attaatccaa aaagactgag aactcttagta actacgtact	120
acttaaacct tatccagttt cttgaaacag agtactctga tca atg aac tca ttt	175

Met Asn Ser Phe

1

tca gct ttt tct gaa atg ttt ggc tcc gat tac gag cct caa ggc gga	223
Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Pro Gln Gly Gly	

5	10	15	20
---	----	----	----

gat tat tgt ccg acg ttg gcc acg agt tgt ccg aag aaa ccg gcg ggc	271
Asp Tyr Cys Pro Thr Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly	

25	30	35
----	----	----

cgt aag aag ttt cgt gag act cgt cac cca att tac aga gga gtt cgt	319
Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg	

40	45	50
----	----	----

caa aga aac tcc ggt aag tgg gtt tct gaa gtg aga gag cca aac aag	367
Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Ser Glu Val Arg Glu Pro Asn Lys	

55	60	65
----	----	----

aaa acc agg att tgg ctc ggg act ttc caa acc gct gag atg gca gct	415
Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala	

70	75	80
----	----	----

cgt gct cac gac gtc gct gca tta gcc ctc cgt ggc cga tca gca tgt	463
Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys	

85	90	95	100
----	----	----	-----

ctc aac ttc gct gac tcg gct tgg cgg cta cga atc ccg gag tca aca	511
Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr	

105	110	115
-----	-----	-----

tgc gcc aag gat atc caa aaa gcg gct gct gaa gcg gcg ttg gct ttt	559
Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala Glu Ala Ala Leu Ala Phe	

120	125	130
-----	-----	-----

(19)

特開2000-116260

35

36

caa gag gag acg tgt gat acg acg acc acg aat cat ggc ctg gac atg	607		
Gln Asp Glu Thr Cys Asp Thr Thr Thr Asn His Gly Leu Asp Met			
135	140	145	
gag gag acg atg gtg gaa gct att tat aca ccg gaa cag agc gaa ggt	655		
Glu Glu Thr Met Val Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Ser Glu Gly			
150	155	160	
gcg ttt tat atg gat gag gag aca atg ttt ggg atg ccg act ttg ttg	703		
Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Thr Met Phe Gly Met Pro Thr Leu Leu			
165	170	175	180
gat aat atg gct gaa ggc atg ctt tta ccg ccg ccg tct gtt caa tgg	751		
Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro Pro Pro Ser Val Gln Trp			
185	190	195	
aat cat aat tat gac ggc gaa gga gat ggt gac gtg tcg ctt tgg agt	799		
Asn His Asn Tyr Asp Gly Glu Gly Asp Gly Asp Val Ser Leu Trp Ser			
200	205	210	
tac taatatcga tagtcgttc cattttgtta ctatagtttg aaaatattct	852		
Tyr			
agtccctttt tttagaatgg ttccttcatt ttattttatt ttatttgtt agaaacgagt	912		
ggaaaataat tcaatacataaa aaaaa	937		

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 213

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 6

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu			
1	5	10	15
Pro Gln Gly Gly Asp Tyr Cys Pro Thr Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys			
20	25	30	
Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr			
35	40	45	
Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Ser Glu Val Arg			
50	55	60	
Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala			
65	70	75	80
Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Leu Ala Leu Arg Gly			
85	90	95	
Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile			
100	105	110	
Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Lys Ala Ala Ala Glu Ala			
115	120	125	
Ala Leu Ala Phe Gln Asp Glu Thr Cys Asp Thr Thr Thr Asn His			
130	135	140	
Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Met Val Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu			
145	150	155	160
Gln Ser Glu Gly Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Thr Met Phe Gly Met			
165	170	175	
Pro Thr Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu Pro Pro Pro			
180	185	190	

(20)

特開2000-116260

37

38

Ser Val Gln Trp Asn His Asn Tyr Asp Gly Glu Gly Asp Gly Asp Val

195

200

205

Ser Leu Trp Ser Tyr

210

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 944

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (135)..(782)

&lt;400&gt; 7

cctgaattag aaaagaaaaga tagatagaga aataaatatt ttatcatacc atacaaaaaa 60

agacagagat ctctactta ctctactetc ataaaccta tccagttct taaaacagag 120

tactttctg atca atg aac tca ttt tct gcc ttt tct gaa atg ttt ggc 170

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly

1

5

10

tcc gat tac gag tct ccg gtt tcc tca ggc ggt gat tac agt ccg aag 218

Ser Asp Tyr Glu Ser Pro Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ser Pro Lys

15

20

25

ctt gcc acg agc tgc ccc aag aaa cca gcg gga agg aag aag ttt cgt 266

Leu Ala Thr Ser Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg

30

35

40

gag act cgt cac cca att tac aga gga gtt cgt caa aga aac tcc ggt 314

Glu Thr Arg His Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly

45

50

55

60

aag tgg gtg tgt gag ttg aga gag cca aac aag aaa acg agg att tgg 362

Lys Trp Val Cys Glu Leu Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp

65

70

75

ctc ggg act ttc caa acc gct gag atg gca gct cgt gct cac gac gtc 410

Leu Gly Thr Phe Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val

80

85

90

gcc gcc ata gct ctc cgt ggc aga tct gcc tgt ctc aat ttc gct gac 458

Ala Ala Ile Ala Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp

95

100

105

tcg gct tgg egg cta cga atc ccg gaa tca acc tgt gcc aag gaa atc 506

Ser Ala Trp Arg Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Glu Ile

110

115

120

caa aag gcg gcg gct gaa gcc gcg ttg aat ttt caa gat gag atg tgt 554

Gln Lys Ala Ala Ala Glu Ala Ala Leu Asn Phe Gln Asp Glu Met Cys

125

130

135

140

cat atg acg acg gat gct cat ggt ctt gac atg gag gag acc ttg gtg 602

His Met Thr Thr Asp Ala His Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Leu Val

145

150

155

gag gct att tat acg ccg gaa cag agc caa gat ggc ttt tat atg gat 650

Glu Ala Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Ser Gln Asp Ala Phe Tyr Met Asp

160

165

170

(21)

特開 2 0 0 0 - 1 1 6 2 6 0

39

40

gaa gag gcg atg ttg ggg atg tct agt ttg ttg gat aac atg gcc gaa 698  
 Glu Glu Ala Met Leu Gly Met Ser Ser Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu  
 175 180 185  
 ggg atg ctt tta ccg tcg ccg tcg gtt caa tgg aac tat aat ttt gat 746  
 Gly Met Leu Leu Pro Ser Pro Ser Val Gln Trp Asn Tyr Asn Phe Asp  
 190 195 200  
 gtc gag gga gat gat gac gtg tcc tta tgg agc tat taaaattcga 792  
 Val Glu Gly Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr  
 205 210 215  
 tttttatttc catttttgtt attatagttt ttatatacatt tgatccccc tttagaatgg 852  
 tcttcttctt ttttggttg tgagaaacga atgttaatgg taaaagggtgt tgtcaaatgc 912  
 aaatgtttt gagtgcagaa tatataatct tt 944

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 216

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 8

Met Asn Ser Phe Ser Ala Phe Ser Glu Met Phe Gly Ser Asp Tyr Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Pro Val Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ser Pro Lys Leu Ala Thr Ser  
 20 25 30  
 Cys Pro Lys Lys Pro Ala Gly Arg Lys Lys Phe Arg Glu Thr Arg His  
 35 40 45  
 Pro Ile Tyr Arg Gly Val Arg Gln Arg Asn Ser Gly Lys Trp Val Cys  
 50 55 60  
 Glu Leu Arg Glu Pro Asn Lys Lys Thr Arg Ile Trp Leu Gly Thr Phe  
 65 70 75 80  
 Gln Thr Ala Glu Met Ala Ala Arg Ala His Asp Val Ala Ala Ile Ala  
 85 90 95  
 Leu Arg Gly Arg Ser Ala Cys Leu Asn Phe Ala Asp Ser Ala Trp Arg  
 100 105 110  
 Leu Arg Ile Pro Glu Ser Thr Cys Ala Lys Glu Ile Gln Lys Ala Ala  
 115 120 125  
 Ala Glu Ala Ala Leu Asn Phe Gln Asp Glu Met Cys His Met Thr Thr  
 130 135 140  
 Asp Ala His Gly Leu Asp Met Glu Glu Thr Leu Val Glu Ala Ile Tyr  
 145 150 155 160  
 Thr Pro Glu Gln Ser Gln Asp Ala Phe Tyr Met Asp Glu Glu Ala Met  
 165 170 175  
 Leu Gly Met Ser Ser Leu Leu Asp Asn Met Ala Glu Gly Met Leu Leu  
 180 185 190  
 Pro Ser Pro Ser Val Gln Trp Asn Tyr Asn Phe Asp Val Glu Gly Asp  
 195 200 205  
 Asp Asp Val Ser Leu Trp Ser Tyr  
 210 215

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1513

(22)

特開 2 0 0 0 - 1 1 6 2 6 0

41

42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (183)..(1172)

&lt;400&gt; 9

gagacgctag	aaagaacgcg	aaagcttgcg	aagaagattt	gcttttgate	gacttaaacac	60
gaacaacaaa	caacatctgc	gtgataaaga	agagattttt	gcctaaataa	agaagagatt	120
cgactcta	cctggagtt	tcattcacga	tagattctt	gattgcgact	ataaagaaga	180
ag atg	gct gta	tat gaa	caa acc	gga acc	gag cag	227
Met Ala	Val Tyr	Glu Gln	Thr Gly	Thr Glu	Gln Pro Lys	Arg
1	5	10	15			
aaa tct	agg gct	cga gca	ggt ggt	tta acg	gtg gct	275
Lys Ser	Arg Ala	Arg Ala	Gly Gly	Leu Thr	Val Ala Asp	Arg Leu Lys
20	25	30				
aag tgg	aaa gag	tac aac	gag att	gtt gaa	gct tcg	323
Lys Trp	Lys Glu	Tyr Asn	Glu Ile	Val Glu	Ala Ser	Ala Val Lys Glu
35	40	45				
gga gag	aaa ccg	aaa cgc	aaa gtt	cct gcg	aaa ggg	371
Gly Glu	Lys Pro	Lys Arg	Lys Val	Pro Ala	Lys Gly	Ser Lys Gly
50	55	60				
tgt atg	aag ggt	aaa gga	gga cca	aat tct	cac tgt	419
Cys Met	Lys Gly	Lys Gly	Gly Pro	Asp Asn	Ser His Cys	Ser Phe Arg
65	70	75				
gga gtt	aga caa	agg att	tgg ggt	aaa tgg	gtt gca	467
Gly Val	Arg Gln	Arg Ile	Trp Gly	Lys Trp	Val Ala Glu	Ile Arg Glu
80	85	90				
ccg aaa	ata gga	act aga	ctt tgg	ctt ggt	act ttt	515
Pro Lys	Ile Gly	Thr Arg	Leu Trp	Leu Gly	Thr Phe	Pro Thr Ala Glu
100	105	110				
aaa gct	gct tcc	gct tat	gat gaa	gcg gct	acc gct	563
Lys Ala	Ala Ser	Ala Tyr	Asp Glu	Ala Ala	Thr Ala Met	Tyr Gly Ser
115	120	125				
ttg gct	cgt ctt	aac ttc	cct cag	tct gtt	ggg tct	611
Leu Ala	Arg Leu	Asn Phe	Pro Gln	Ser Val	Gly Ser	Glu Phe Thr Ser
130	135	140				
acg tct	agt caa	tct gag	gtg tgt	acg gtt	aat aag	659
Thr Ser	Ser Gln	Ser Glu	Val Cys	Thr Val	Glu Asn	Lys Ala Val Val
145	150	155				
tgt ggt	gat gtt	tgt gtg	aag cat	gaa gat	act gat	707
Cys Gly	Asp Val	Cys Val	Lys His	Glu Asp	Thr Asp	Cys Glu Ser Asn
160	165	170				
cca ttt	agt cag	att tta	gat gtt	aga gaa	gag tct	755
Pro Phe	Ser Gln	Ile Leu	Asp Val	Arg Glu	Glu Ser	Cys Gly Thr Arg
180	185	190				
ccg gac	agt tgc	acg gtt	gga cat	caa gat	atg aat	803
Pro Asp	Ser Cys	Thr Val	Gly His Gln	Asp Met	Asn Ser	Ser Leu Asn
195	200	205				

(23)

特開 2 0 0 0 - 1 1 6 2 6 0

43

44

tac gat ttg ctg tta gag ttt gag cag cag tat tgg ggc caa gtt ttg	851		
Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Phe Glu Gln Gln Tyr Trp Gly Gln Val Leu			
210	215	220	
cag gag aaa gag aaa ccg aag cag gaa gaa gag gag ata cag caa cag	899		
Gln Glu Lys Glu Lys Pro Lys Gln Glu Glu Glu Ile Gln Gln Gln			
225	230	235	
caa cag gaa cag caa cag caa cag ctg caa ccg gat ttg ctt act gtt	947		
Gln Gln Glu Gln Gln Gln Gln Leu Gln Pro Asp Leu Leu Thr Val			
240	245	250	255
gca gat tac ggt tgg cct tgg tct aat gat att gta aat gat cag act	995		
Ala Asp Tyr Gly Trp Pro Trp Ser Asn Asp Ile Val Asn Asp Gln Thr			
260	265	270	
tct tgg gat cct aat gag tgc ttt gat att aat gaa ctc ctt gga gat	1043		
Ser Trp Asp Pro Asn Glu Cys Phe Asp Ile Asn Glu Leu Leu Gly Asp			
275	280	285	
ttg aat gaa cct ggt ccc cat cag agc caa gac caa aac cac gta aat	1091		
Leu Asn Glu Pro Gly Pro His Gln Ser Gln Asp Gln Asn His Val Asn			
290	295	300	
tct ggt agt tat gat ttg cat ccg ctt cat ctc gag cca cac gat ggt	1139		
Ser Gly Ser Tyr Asp Leu His Pro Leu His Leu Glu Pro His Asp Gly			
305	310	315	
cac gag ttc aat ggt ttg agt tct ctg gat att tgagaggctt gaggcaatgg	1192		
His Glu Phe Asn Gly Leu Ser Ser Leu Asp Ile			
320	325	330	
tcctacaaga ctacaacata atctttggat tgatcatagg agaaacaaga aataggttt 1252			
aatgatctga ttccaaatga aaaaatattt aataactcta tagttttgt tctttcccttg 1312			
gatcatgaac ttgtgcttct catctattga gttaatatag cgaatagcag agtttctctc 1372			
tttcttctt tttagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaay sakmabgcar 1432			
srcsdvsnna nntrnatnar sarchentrr agrtrascn csrcaswash tskbabarak 1492			
aantamaysa kmasrungna c	1513		

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 10

Met Ala Val Tyr Glu Gln Thr Gly Thr Glu Gln Pro Lys Lys Arg Lys			
1	5	10	15
Ser Arg Ala Arg Ala Gly Gly Leu Thr Val Ala Asp Arg Leu Lys Lys			
20	25	30	
Trp Lys Glu Tyr Asn Glu Ile Val Glu Ala Ser Ala Val Lys Glu Gly			
35	40	45	
Glu Lys Pro Lys Arg Lys Val Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly Cys			
50	55	60	
Met Lys Gly Lys Gly Pro Asp Asn Ser His Cys Ser Phe Arg Gly			
65	70	75	80
Val Arg Gln Arg Ile Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro			
85	90	95	
Lys Ile Gly Thr Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Glu Lys			

45

46

100	105	110
Ala Ala Ser Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Thr Ala Met Tyr Gly Ser Leu		
115	120	125
Ala Arg Leu Asn Phe Pro Gln Ser Val Gly Ser Glu Phe Thr Ser Thr		
130	135	140
Ser Ser Gln Ser Glu Val Cys Thr Val Glu Asn Lys Ala Val Val Cys		
145	150	155
Gly Asp Val Cys Val Lys His Glu Asp Thr Asp Cys Glu Ser Asn Pro		
165	170	175
Phe Ser Gln Ile Leu Asp Val Arg Glu Glu Ser Cys Gly Thr Arg Pro		
180	185	190
Asp Ser Cys Thr Val Gly His Gln Asp Met Asn Ser Ser Leu Asn Tyr		
195	200	205
Asp Leu Leu Leu Glu Phe Glu Gln Gln Tyr Trp Gly Gln Val Leu Gln		
210	215	220
Glu Lys Glu Lys Pro Lys Gln Glu Glu Glu Ile Gln Gln Gln Gln		
225	230	235
Gln Glu Gln Gln Gln Gln Leu Gln Pro Asp Leu Leu Thr Val Ala		
245	250	255
Asp Tyr Gly Trp Pro Trp Ser Asn Asp Ile Val Asn Asp Gln Thr Ser		
260	265	270
Trp Asp Pro Asn Glu Cys Phe Asp Ile Asn Glu Leu Leu Gly Asp Leu		
275	280	285
Asn Glu Pro Gly Pro His Gln Ser Gln Asp Gln Asn His Val Asn Ser		
290	295	300
Gly Ser Tyr Asp Leu His Pro Leu His Leu Glu Pro His Asp Gly His		
305	310	315
Glu Phe Asn Gly Leu Ser Ser Leu Asp Ile		
325	330	

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A gene and having HindIII site.

&lt;400&gt; 11

aagcttaaggc ttacatcagt ttgaaagaaaa

30

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A gene and having HindIII site.

<400> 12  
aagcttaagg ttgcttttg gaactcatgt c 31

<210> 13  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Designed oligonucleotide based on DREB1A gene and having BamHI site.

<400> 13  
aagcttaagg ttgccataga tgcaattcaa tc 32  
<210> 14  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Designed oligonucleotide based on DREB1A gene and having BamHI site.

<400> 14  
aagcttaagg ttttccaaag attttttct ttccaa 36

<210> 15  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A gene and having HindIII site.

<400> 15  
ggatccggat ccatgaactc attttctgct 30  
<210> 16  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Designed oligonucleotide based on the promoter region of rd29A gene and having HindIII site.

<400> 16

(26)

特開 2 0 0 0 - 1 1 6 2 6 0

49

50

ggatccggat ccttaataac tccataacga ta

32

<210> 17

<211> 941

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 17

gccccatggatc caattcaatc aaactgaaat ttctgcaaga atctcaaaca cgaggatctc 60  
aaagtttgcgaa agaaaaattta ttcttcgac tcaaaacaaa cttacgaaat ttaggttagaa 120  
cttatataca ttatattgtt atttttgtt acaaaatgtt ttatttattt ttatagaatt 180  
ttactggta aattaaaaat gaatagaaaa ggtgaattaa gaggagagag gaggtaaaca 240  
ttttcttcata ttttcaggat aaattattgtt aaaagtttac aagatttcca 300  
tttgactagt gttaaatgagg aatattctt agtaagatca ttatttcata tactttttt 360  
atcttctacc agtagaggaa taaacaatat ttagctccct tgtaaataca aattaatttt 420  
cctttttgac atcatcaat ttaattttt cgtataaaat aaaagatcat acctattaga 480  
acgatttaagg agaatacaca ttgcgtatgg aaggatgtgc cgtttgttat aataaacgc 540  
cacacgacgt aaacgtaaaaa tgaccatcg atggccat agacatggac cgactactaa 600  
taatagtaag ttacattttta ggatggata aatatcatac cgacatcgtt tttgaaagaa 660  
aaggaaaaaa aagaaaaaaat aaataaaaga tatactacc acatgagttc caaaaagcaa 720  
aaaaaaagat caagccgaca cagacacgac tagagagcaa aatgactttg acgtcacacc 780  
acgaaaacag acgettccata cgtgtccctt tatctcttc agtctctca taaacttagt 840  
gagaccctcc tctgttttac tcacaaatat gcaaactaga aaacaatcat caggaataaa 900  
gggtttgatt acttcttattt gaaagaaaaaa aatctttgga a 941

<210> 18

<211> 71

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

cagtttggaa gaaaaggaa aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta ccgacatgag 60  
ttccaaaaag c 71

<210> 19

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide having a partially mutated sequence within the  
DRE region.

<400> 19

cagtttggaa gaaaaggaa aaaaagaaaa aataaataaa agatataattt tcgacatgag 60  
ttccaaaaag c 71

<210> 20

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide having a partially mutated sequence within the DRE region.

&lt;400&gt; 20

cagttgaaa gaaaaggaa aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta cttttatgag 60  
ttccaaaaag c 71

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 71

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide having a partially mutated sequence within the DRE region.

&lt;400&gt; 21

cagttgaaa gaaaaggaa aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta ccgacaaaag 60  
ttccaaaaag c 71

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 71

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide having a partially mutated sequence outside the DRE region.

&lt;400&gt; 22

cagttgaaa gaaaaggaa aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta ccgacatgtat 60  
caacaaaaag c 71

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 71

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide having a partially mutated sequence outside the DRE region.

&lt;400&gt; 23

cagttgaaa gaaaaggaa aaaaagaaaa aataaataaa agatatacta ccgacatgag 60  
ttcggttaag c 71

【0098】

【配列表フリーテキスト】

【0099】

【配列番号11】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオ

50 チド。

## 【0100】

【配列番号12】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオチド。

## 【0101】

【配列番号13】 DREB1A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、BamHI部位を有するオリゴヌクレオチド。

## 【0102】

【配列番号14】 DREB1A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、BamHI部位を有するオリゴヌクレオチド。

## 【0103】

【配列番号15】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオチド。

## 【0104】

【配列番号16】 rd29A遺伝子のプロモーター領域に基づいて設計した、HindIII部位を有するオリゴヌクレオチド。

## 【0105】

【配列番号19】 DRE領域内の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

## 【0106】

【配列番号20】 DRE領域内の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

## 【0107】

【配列番号21】 DRE領域内の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

## 【0108】

\* 【配列番号22】 DRE領域外の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

## 【0109】

【配列番号23】 DRE領域外の配列を一部変異させたオリゴヌクレオチド。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】DREB遺伝子のスクリーニング方法の原理を示す図である。

10 【図2】DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質のDREへの結合特性に関するゲルシフトアッセイに用いたプローブの構造及び該アッセイの結果を示す電気泳動写真である。

【図3】DREB1Aタンパク質及びDREB2Aタンパク質の転写活性化能を示す図である。

【図4】CAMV35Sプロモーターを含む植物導入用組換えプラスミドの構造を示す図である。

【図5】DREB1A遺伝子導入植物におけるストレス負荷時の各遺伝子の転写レベルを示す電気泳動写真である。

20 【図6】DREB1A遺伝子導入植物の凍結ストレス又は乾燥ストレスを与えた場合の植物の生育を示した写真である(生物の形態)。

【図7】rd29A遺伝子プロモーターを含む植物導入用組換えプラスミドの構造を示す図である。

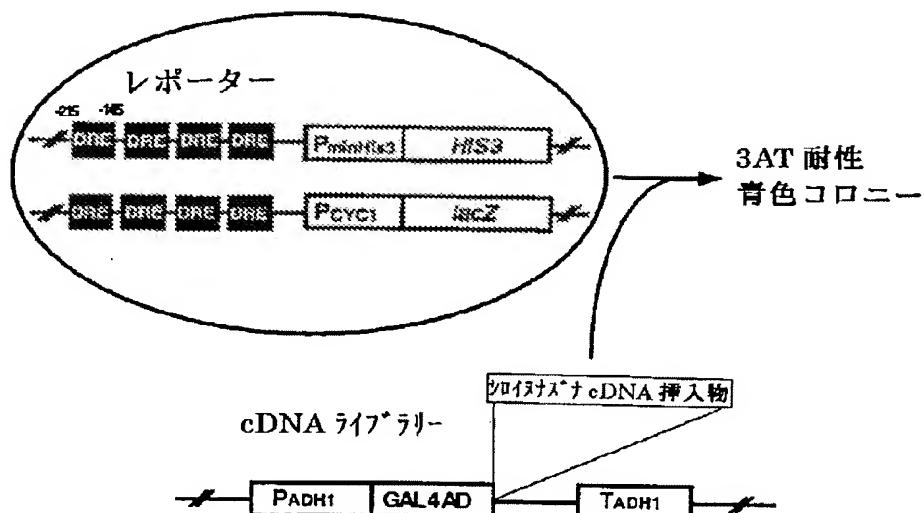
【図8】pBI35S:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物の生育を示す写真である(生物の形態)。

【図9】pBI29AP:DREB1Aを導入したトランスジェニック植物の生育を示す写真である(生物の形態)。

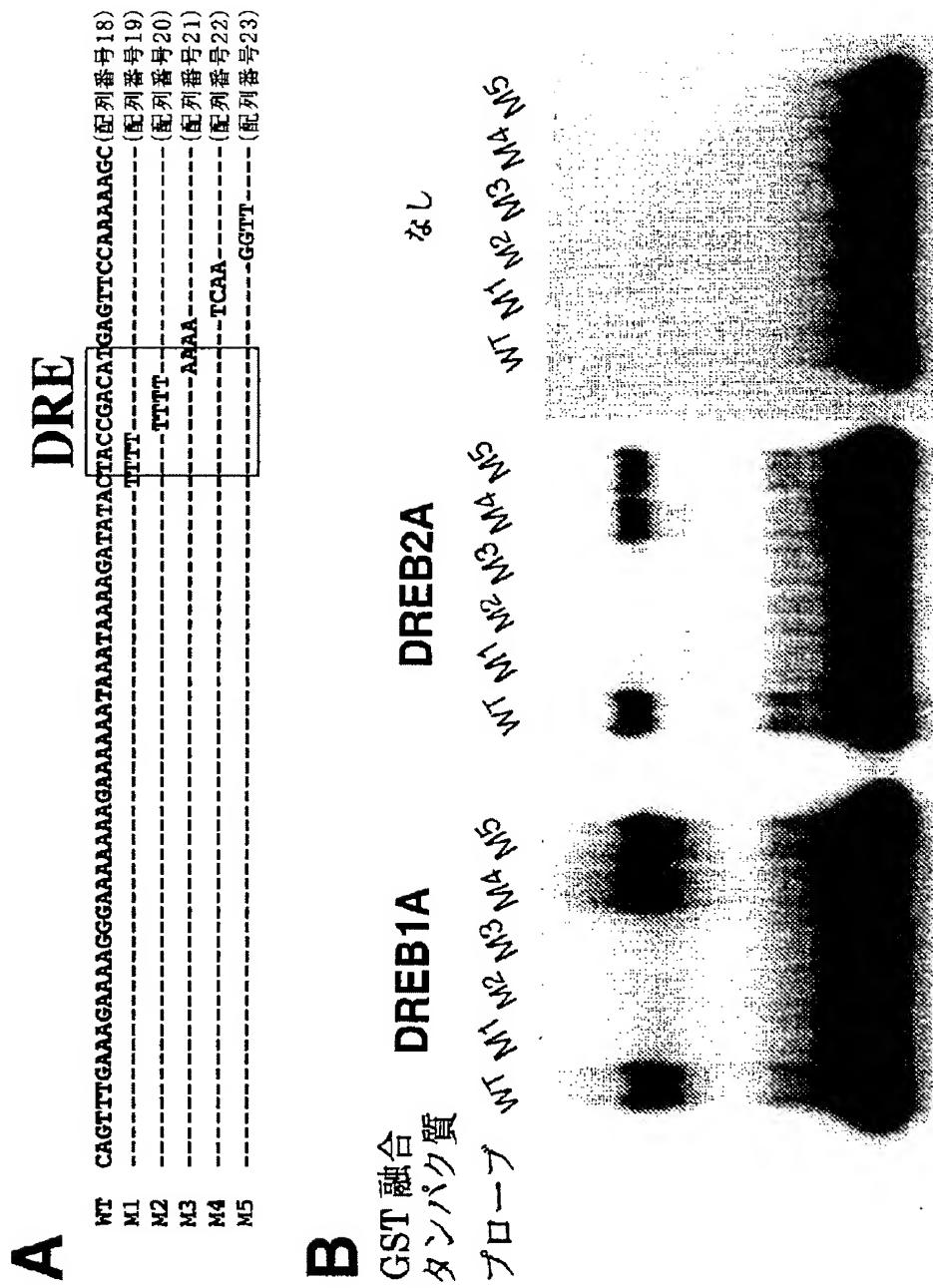
【図10】ストレス負荷後のトランスジェニック植物の生存を示す写真である(生物の形態)。

\*30

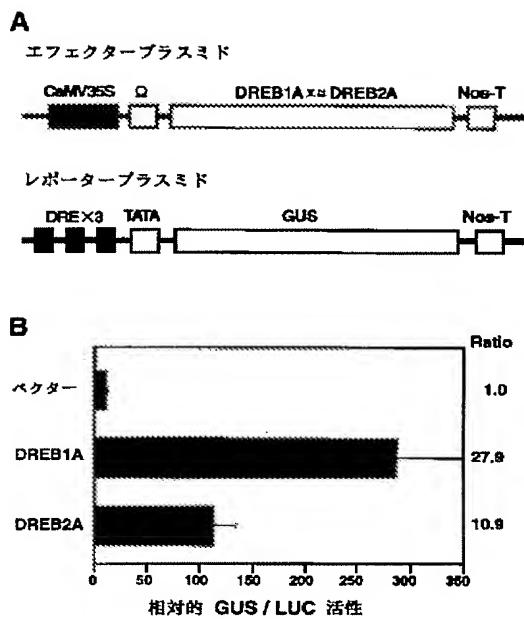
## 【図1】



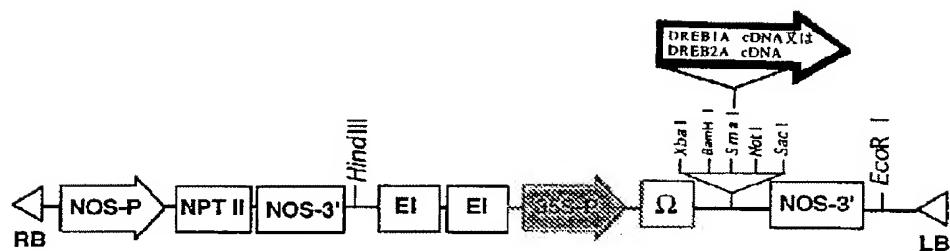
【図2】



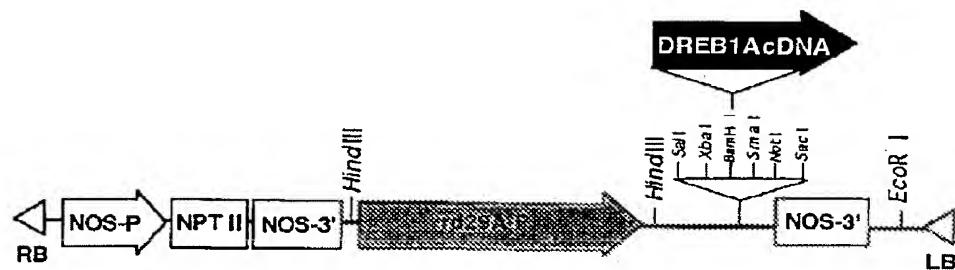
【図3】



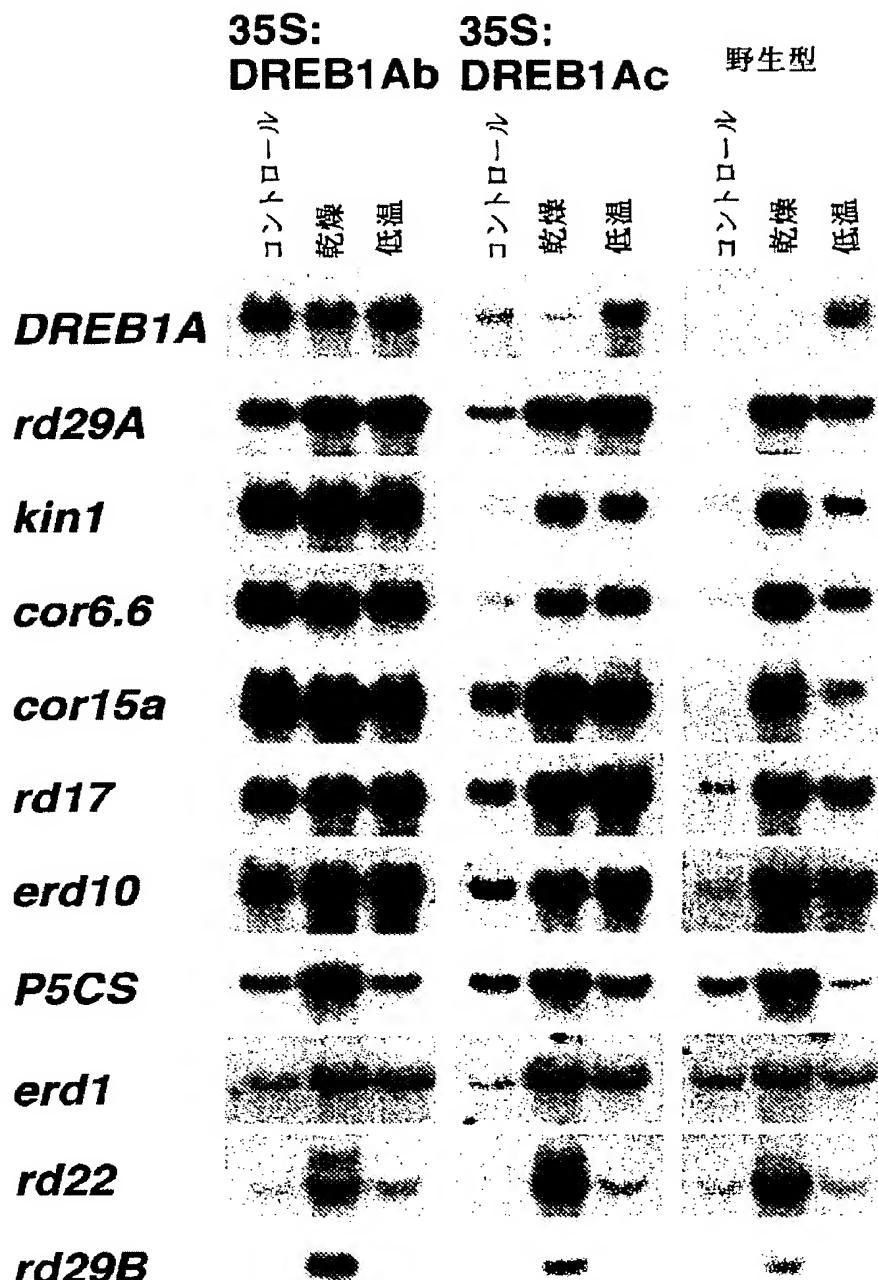
【図4】



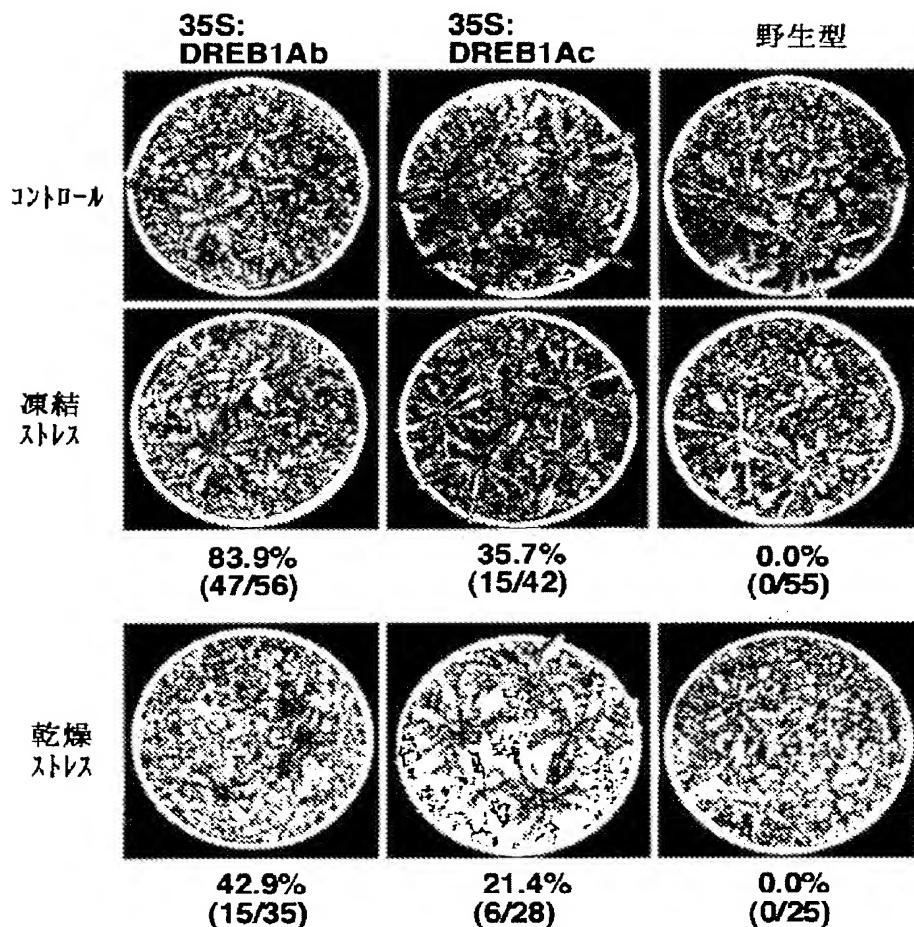
【図7】



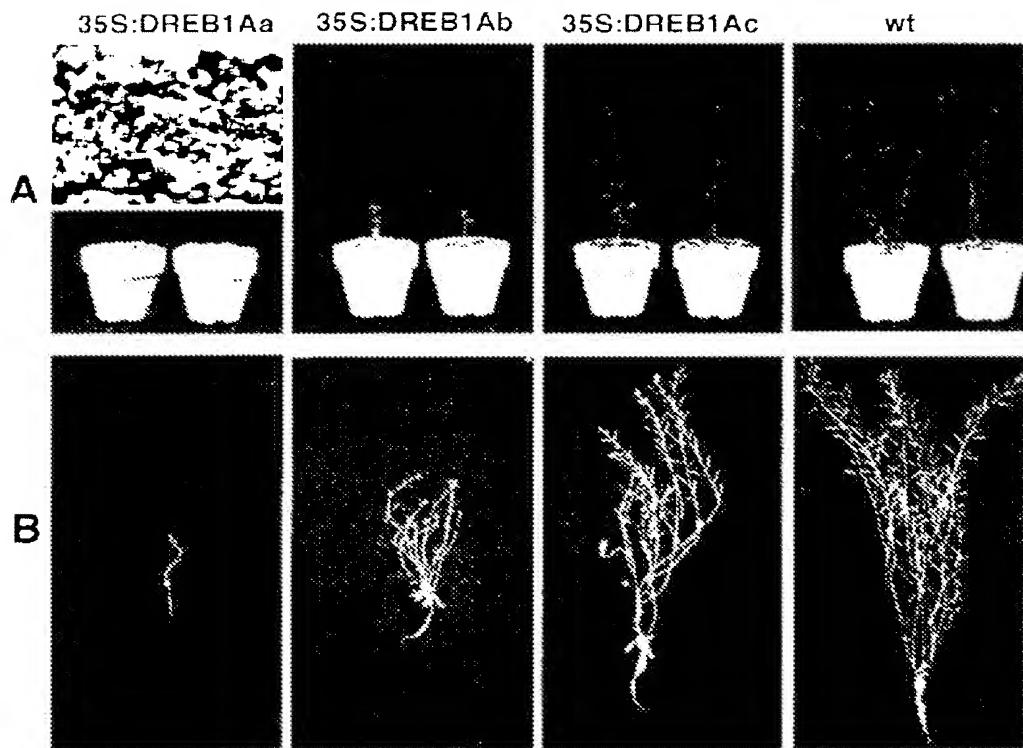
【図5】



【図6】



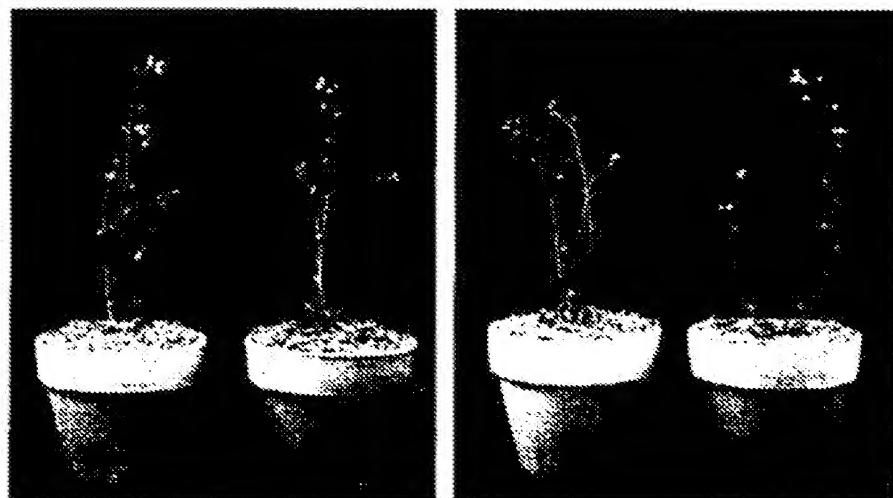
【図8】



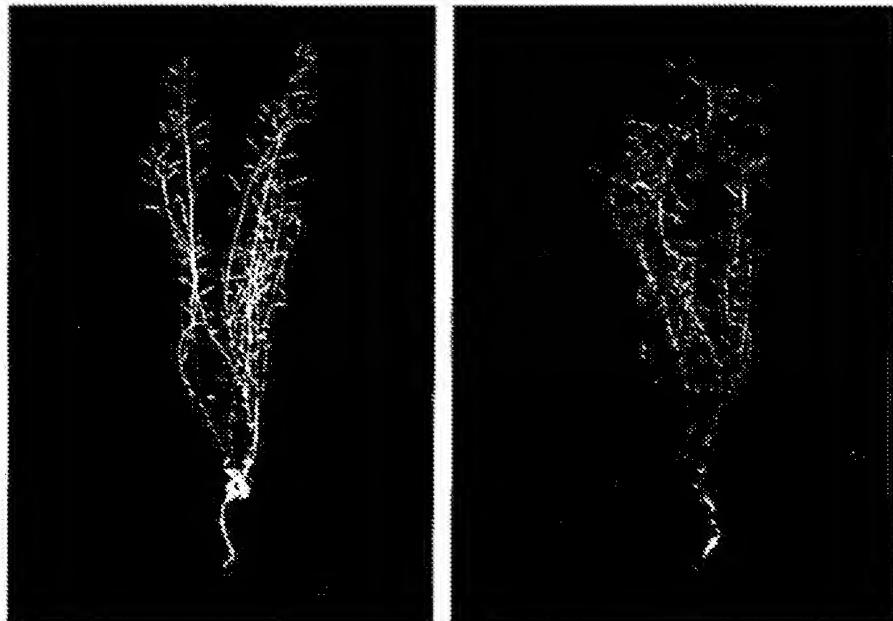
【図9】

**rd29A:DREB1Aa      wt**

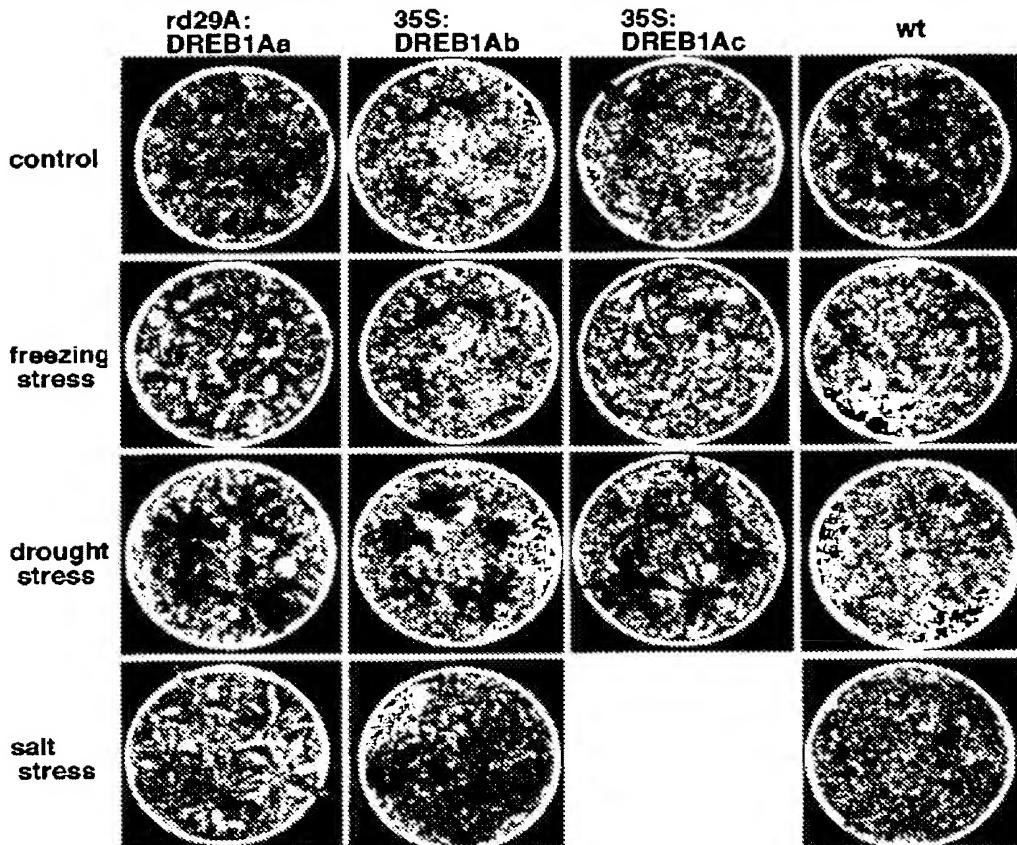
**A**



**B**



【図10】



## 【手続補正書】

【提出日】平成11年10月12日(1999.10.12)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ストレス応答性プロモーターに、転写因子をコードする遺伝子が連結されたDNAが導入されたトランジェニック植物であって、当該転写因子が、当該ストレス応答性プロモーターに結合し、且つ、当該転写因子をコードする遺伝子の転写を活性化することができるものであるトランジェニック植物。

【請求項2】ストレス応答性プロモーターが乾燥ストレス応答性エレメントを含むプロモーターである請求項1に記載のトランジェニック植物。

【請求項3】ストレス応答性プロモーターがrd29A遺伝

子プロモーターである請求項1に記載のトランジェニック植物。

【請求項4】転写因子がDREB1タンパク質である請求項1に記載のトランジェニック植物。

【請求項5】ストレス応答性プロモーターに、転写因子をコードする遺伝子が連結されたDNAを導入することを特徴とするトランジェニック植物の作成方法であつて、当該転写因子が、当該ストレス応答性プロモーターに結合し、且つ、当該転写因子をコードする遺伝子の転写を活性化することができるものであるトランジェニック植物の作成方法。

【請求項6】ストレス応答性プロモーターが乾燥ストレス応答性エレメントを含むプロモーターである請求項5に記載のトランジェニック植物の作成方法。

【請求項7】ストレス応答性プロモーターがrd29A遺伝子プロモーターである請求項5に記載のトランジェニック植物の作成方法。

【請求項8】転写因子がDREB1タンパク質である請求項

【書類名】	受託番号変更届	* 工業技術研究所
【整理番号】	P 9 8 - 0 3 9 2	【新受託番号】 F E R M B P - 6 6 5 4
【提出日】	平成11年2月22日(199 9. 2. 22)	【旧寄託機関の名称】 通商産業省工業技術院生命工学 工業技術研究所
【旧寄託機関の名称】	通商産業省工業技術院生命工学	【旧受託番号】 F E R M P - 1 6 9 3 7
工業技術研究所		【新寄託機関の名称】 通商産業省工業技術院生命工学
【旧受託番号】	F E R M P - 1 6 9 3 6	工業技術研究所
【新寄託機関の名称】	通商産業省工業技術院生命工学*	【新受託番号】 F E R M B P - 6 6 5 5

---

フロントページの続き

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD04 CA06 CA17  
                   CA19 CB02 CD03 CD07 CD10  
                   CD13 CD17 CD21  
         4B024 AA08 BA80 CA04 DA01 EA04  
                   FA01 FA02 FA10 GA11 HA01  
         4H045 AA10 AA30 BA10 CA30 EA05  
                   EA60 FA72 FA74